



SKRIPSI - SK141501

**OPTIMASI AMOBILISASI BROMELIN MENGGUNAKAN
MATRIKS PENDUKUNG KITOSAN**

MALIHA SYA'BANA
NRP 1412 100 702

Dosen Pembimbing
Drs. Refdinal Nawfa, M.S.

JURUSAN KIMIA
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Institut Teknologi Sepuluh Nopember
Surabaya
2016



SCRIPT - SK141501

**OPTIMIZATION OF IMMOBILIZATION OF BROMELAIN
USING SUPPORT MATRIX CHITOSAN**

MALIHA SYA'BANA
NRP 1412 100 702

Supervisor
Drs. Refdinal Nawfa, M.S.

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
Faculty of Mathematic And Natural Sciences
Institut Teknologi Sepuluh Nopember
Surabaya
2016

LEMBAR PENGESAHAN
OPTIMASI AMOBILISASI BROMELIN MENGGUNAKAN
MATRIKS PENDUKUNG KITOSAN

SKRIPSI

Oleh :

MALIHA SYA'BANA
NRP. 1412 100 702

Surabaya, 26 Juli 2016

Menyetujui,
Dosen Pembimbing



Drs. Refdinal Nawfa, M.S.
NIP. 19580425 198701 1 001

Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia



Prof. Dr. Didik Prasetyoko, S.Si., M.Sc.
NIP. 19710616 199703 1 002

OPTIMASI AMOBILISASI BROMELIN MENGGUNAKAN MATRIKS PENDUKUNG KITOSAN

Nama : MALIHA SYA'BANA
NRP : 1412100702
Jurusan : Kimia FMIPA ITS
Dosen Pembimbing : Drs. Refdinal Nawfa, M.S.

ABSTRAK

Optimasi amobilisasi bromelin dengan matriks pendukung kitosan telah diteliti. Enzim bromelin yang diisolasi dari buah nanas mentah maupun matang diperoleh aktivitas tertinggi pada pengendapan 40% dengan ammonium sulfat jenuh. Kondisi optimum amobilisasi enzim bromelin didapatkan pada konsentrasi kitosan 240,4 mg dan bromelin 10 mg dengan jumlah enzim teramobil 9,5417 mg dan aktivitas dalam 10 mg enzim amobil yang diuji adalah 86,2067 Unit. Uji aktivitas enzim amobil terhadap pengaruh substrat kasein didapatkan aktivitas tertinggi pada kasein 3000 ppm. Uji perulangan enzim amobil dapat digunakan hingga enam kali dengan efisiensi 57,69%.

Kata Kunci: Bromelin, amobilisasi, kitosan, kasein, aktivitas, efisiensi.

OPTIMIZATION OF IMMOBILIZATION OF BROMELAIN USING SUPPORT MATRIX CHITOSAN

Name : MALIHA SYA'BANA
NRP : 1412100702
Department : Chemistry FMIPA ITS
Supervisor : Drs. Refdinal Nawfa, M.S.

ABSTRACT

Optimization of immobilization of bromelain using support matrix chitosan had been investigated. Bromelain enzyme which had been isolated from raw pineapple and ripe pineapple obtained the highest activity at 40% precipitation with ammonium sulfate saturation. Optimum condition of immobilization bromelain was on 240,4 mg chitosan concentration and 10 mg bromelain concentration with restrained enzyme and activity was 9,5417 mg and 86,2067 Unit. Activity assay of bromelain immobilized to the effect of casein substrate obtained the highest activity on 3000 ppm casein concentration. Repetition assay of bromelain immobilized can be used until six times reusable with 57,69% efficiency.

Keywords: Bromelain, immobilization, chitosan, casein, activity, efficiency.

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Perumusan Masalah	2
1.3. Tujuan Penelitian	3
1.4. Batasan Masalah	3
1.5. Manfaat Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Enzim Bromelin	5
2.2. Isolasi Enzim Bromelin	6
2.2.1. Pengendapan Enzim dengan Amonium Sulfat	6
2.2.2. Pemisahan Enzim dengan Sentrifugasi	7
2.3. Aktivitas Enzim	7
2.4. Amobilisasi Enzim	8
2.5. Kitosan	10
2.6. Kasein	15
2.7. Analisa Protein Metode Biuret	15
2.8. Spektrofotometri UV-Visible	16
2.9. Spektrofotometri Infra Red (IR)	19
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	20
3.1. Alat dan Bahan	21
3.1.1. Alat	21
3.1.2. Bahan	21
3.2. Prosedur Penelitian	21
3.2.1. Isolasi Kitin	21
3.2.1.1. Demineralisasi Kitin	21
3.2.1.2. Deproteinasi Kitin	22
3.2.2. Transformasi Kitin menjadi Kitosan	22
3.2.3. Penentuan Kadar Protein	22
3.2.3.1. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum ...	22

3.2.3.2. Pembuatan Kurva Standar Kasein	23
3.2.4. Isolasi Enzim Bromelin	23
3.2.5. Amobilisasi Enzim Bromelin.....	24
3.2.5.1. Pengaruh Konsentrasi Kitosan terhadap Aktivitas Enzim	24
3.2.5.2. Pengaruh Konsentrasi Bromelin terhadap Aktivitas Enzim	24
3.2.6. Pengaruh Konsentrasi Substrat terhadap Aktivitas Enzim Bromelin Amobil	24
3.2.7. Pengaruh Perulangan Penggunaan Enzim Bromelin Amobil terhadap Aktivitas Enzim.....	25
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	27
4.1. Isolasi Kitin	27
4.1.1. Demineralisasi	27
4.1.2. Deproteinasi.....	28
4.2. Transformasi Kitin menjadi Kitosan	29
4.3. Penentuan Kadar Protein	31
4.3.1. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum	31
4.3.2. Pembuatan Kurva Standar	32
4.4. Isolasi Bromelin	34
4.5. Amobilisasi Enzim Bromelin.....	36
4.5.1. Pengaruh Konsentrasi Kitosan terhadap Aktivitas Enzim	36
4.5.2. Pengaruh Konsentrasi Bromelin terhadap Aktivitas Enzim	40
4.6. Pengaruh Konsentrasi Substrat terhadap Aktivitas Enzim Bromelin Amobil.....	42
4.7. Pengaruh Perulangan Penggunaan Enzim Bromelin Amobil terhadap Aktivitas Enzim	43
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	47
5.1. Kesimpulan	47
5.2. Saran.....	47
DAFTAR PUSTAKA	49
LAMPIRAN	55
BIODATA PENULIS	75

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Metode <i>cross linking</i> untuk amobilisasi enzim.....	9
Gambar 2.2. Struktur kitin dengan gugus asetamida.	11
Gambar 2.3. Transformasi kitin menjadi kitosan dengan proses deasetilasi menggunakan NaOH 50%.....	11
Gambar 2.4. Reaksi pemutusan gugus asetil pada kitin hingga menjadi kitosan.	12
Gambar 2.5. Struktur kitosan yang terdeasetilasi lebih dari 70% dan belum sempurna.	13
Gambar 2.6. Struktur kitosan dengan gugus amina.	13
Gambar 2.7. Metode baseline untuk menghitung derajat deasetilasi.	14
Gambar 2.8. Pembentukan kompleks ungu Cu-enzim.	16
Gambar 2.9. Komponen spektrofotometer UV-Vis.	18
Gambar 2.10. Komponen spektrofotometer FTIR.....	20
Gambar 4.1. Kulit udang (a) sebelum dihasulkan dan (b) serbuk.....	27
Gambar 4.2. Serbuk kulit udang hasil demineralisasi.	28
Gambar 4.3. Serbuk kitin hasil deproteinasi.....	28
Gambar 4.4. Spektra hasil deasetilasi kitin pertama dengan panjang $DF_1 = 8,8$ cm; $DE = 2,2$ cm; $AC = 8,2$ cm dan $AB = 0,5$ cm.	29
Gambar 4.5. Spektra kitosan hasil perulangan deasetilasi dengan panjang $DF_1 = 6,7$ cm; $DE = 4,7$ cm; $AC = 4,9$ cm dan $AB = 0,5$ cm.	30
Gambar 4.6. Serbuk kitosan.	30
Gambar 4.7. Larutan blanko (biru muda) dan kasein (ungu) yang telah ditambahkan reagen biuret.	31
Gambar 4.8. Kurva absorbansi kasein pada 500-600 nm.	32
Gambar 4.9. Larutan kasein yang ditambah reagen biuret dari kiri ke kanan konsentrasi semakin meningkat.	33
Gambar 4.10. Kurva standar kasein.	33
Gambar 4.11. Fraksi enzim pengendapan ammonium sulfat jenuh 20%-60% dari kiri ke kanan, (a) nanas mentah, (b) nanas matang.	34

Gambar 4.12. Aktivitas fraksi enzim pengendapan ammonium sulfat jenuh.	35
Gambar 4.13. Amobilisasi enzim dengan matriks kitosan.	36
Gambar 4.14. Pengaruh konsentrasi kitosan terhadap enzim yang teramobil.	37
Gambar 4.15. Jumlah enzim teramobil dalam 10 mg massa total enzim amobil.	38
Gambar 4.16. Aktivitas enzim amobil variasi konsentrasi kitosan.	39
Gambar 4.17. Enzim bromelin teramobilisasi kitosan.	39
Gambar 4.18. Pengaruh konsentrasi bromelin terhadap enzim yang teramobil pada 250 mg kitosan.	40
Gambar 4.19. Jumlah enzim teramobil dalam 10 mg massa total enzim amobil.	41
Gambar 4.20. Aktivitas enzim amobil variasi konsentrasi bromelin.	41
Gambar 4.21. Pengaruh konsentrasi substrat kasein terhadap aktivitas enzim amobil.	43
Gambar 4.22. Pengaruh perulangan penggunaan enzim amobil terhadap aktivitas enzim.	44

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Kandungan enzim bromelin pada bagian tanaman nanas.	6
Tabel 2.2. Spektrum cahaya tampak dan warna komplementer..	16
Tabel 4.1. Efisiensi perulangan penggunaan enzim amobil.....	44

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran A Skema kerja.....	55
Lampiran B Pembuatan larutan.....	56
Lampiran C Derajat deasetilasi kitin.....	58
Lampiran D Penentuan Panjang Gelombang Maksimum.....	60
Lampiran E Data Absorbansi Larutan Kasein pada Penentuan Kurva Standar Kasein.....	61
Lampiran F Aktivitas Fraksi Enzim Bromelin.....	62
Lampiran G Pengaruh Konsentrasi Kitosan pada Amobilisasi Enzim Bromelin.....	64
Lampiran H Pengaruh Konsentrasi Enzim pada Amobilisasi Enzim Bromelin.....	69
Lampiran I Pengaruh Konsentrasi Substrat terhadap Aktivitas Enzim Amobil.....	72
Lampiran J Pengaruh Perulangan Penggunaan Enzim Amobil terhadap Aktivitas Enzim.....	73

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Enzim bromelin merupakan kelompok enzim pemecah protein atau disebut juga sebagai enzim protease atau proteolitik yang ditemukan dalam jaringan tumbuhan famili Bromeliceae (Chaurasiya dan Hebbar, 2013). Enzim bromelin dapat mengkatalisis penguraian protein menjadi asam amino melalui reaksi hidrolisis, yaitu penguraian dari molekul besar menjadi molekul yang lebih kecil dengan kombinasi air (Maryam, 2009). Kemampuan enzim bromelin dalam memecah protein, diaplikasikan dalam berbagai industri seperti industri makanan dan farmasi, seperti digunakan untuk melunakkan daging, membantu proses pencernaan maupun sebagai agen antibiotik.

Enzim bromelin paling banyak ditemukan dalam buah nanas (*Ananas comosus*), meskipun terdapat juga dalam buah pisang dengan jumlah yang lebih sedikit. Isolasi enzim bromelin ini dapat dilakukan dengan salah satu cara yaitu pengendapan menggunakan ammonium sulfat jenuh. Hal ini dikarenakan ammonium sulfat memiliki kelarutan yang tinggi dalam air dan tidak bereaksi dengan protein dan polisakarida, sehingga dapat mengendapkan enzim bromelin. Penelitian Salahudin (2011) menyebutkan enzim bromelin yang diperoleh dari pengendapan ammonium sulfat masih memiliki aktivitas katalitiknya. Hasil isolat enzim bromelin yang diperoleh serta nilai aktivitasnya dipengaruhi dari konsentrasi penambahan ammonium sulfat.

Penelitian mengenai amobilisasi enzim bromelin yang membuat enzim menjadi inaktif telah banyak dilakukan. Amobilisasi enzim ini digunakan karena lebih banyak keuntungan yang diperoleh. Dibandingkan dengan enzim bebas, enzim amobil lebih kuat dan tahan terhadap perubahan lingkungan, bersifat heterogen terhadap substrat sehingga enzim dapat diperoleh kembali, dapat digunakan secara berulang serta penghentian reaksi dapat dilakukan secara cepat dengan pemisahan enzim

amobil dari larutan reaksi (Krajewska, 2004). Salah satu metode amobilisasi enzim yang digunakan yaitu metode *cross linking* (ikat silang). Metode ini sering digunakan karena ikatan enzim dengan matriks pendukung stabil sehingga enzim tidak mudah lepas. Enzim akan terjebak di dalam matriks pendukung dengan mencampurkannya terlebih dahulu sebelum disilangkan menggunakan glutaraldehid sebagai pereaksi bifungsional yaitu pengaktivasi dan pengikat silang.

Turunan senyawa kitin dapat digunakan sebagai bahan pengamobil enzim. Cara memperoleh kitin relatif mudah dengan mengisolasinya dari kulit udang yang dilakukan dua tahap proses demineralisasi dan deproteinasi. Penghilangan gugus asetil (deasetilasi) pada kitin mengubahnya menjadi kitosan. Kitosan bersifat tidak beracun dan mudah didegradasi. Selain itu, kitosan mempunyai gugus amina hasil deasetilasi yang dapat berikatan dengan pereaksi bifungsional, sehingga kitosan mampu dijadikan matriks pendukung amobilisasi enzim yang baik.

Besarnya penambahan kitosan yang digunakan dalam amobilisasi enzim bromelin untuk mencapai aktivitas enzim optimum belum sepenuhnya diketahui. Sebaliknya, besarnya enzim bromelin yang teramobil untuk mencapai aktivitas optimumnya belum ada keterangan dari penelitian sebelumnya. Apabila diketahui kadar optimum enzim bromelin teramobil, maka dapat diketahui pula bahwa dengan sejumlah tertentu penggunaan kitosan mampu mengamobilisasi sejumlah tertentu enzim bromelin. Dengan demikian, dapat diketahui perbandingan yang sesuai untuk melakukan amobilisasi enzim bromelin dengan matriks pendukung kitosan.

1.2. Perumusan Masalah

Permasalahan dalam penelitian ini adalah berapa konsentrasi kitosan dan bromelin yang diperlukan untuk amobilisasi sehingga diperoleh aktivitas optimum enzim, serta pengaruh konsentrasi substrat dan perulangan penggunaan enzim amobil terhadap aktivitas enzim.

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui konsentrasi kitosan optimum amobilisasi enzim bromelin, serta mengetahui aktivitas enzim bromelin amobil terhadap pengaruh konsentrasi substrat dan perulangan penggunaannya.

1.4. Batasan Masalah

Permasalahan pada penelitian ini dibatasi oleh:

1. Variasi konsentrasi kitosan (50, 100, 150, 200 dan 250 mg) dalam mengamobil enzim 50 mg.
2. Variasi konsentrasi enzim bromelin (10, 30, 50, 70 dan 90 mg) untuk teramobil pada kitosan optimum.
3. Kemampuan enzim bromelin amobil terhadap penurunan kadar protein dengan pengaruh konsentrasi substrat (1000, 2000 dan 3000 ppm).
4. Perulangan penggunaannya hingga enam kali.

1.5. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini yaitu memberikan informasi ilmiah mengenai optimasi enzim bromelin yang diamobilisasi pada matriks pendukung kitosan.

Halaman ini sengaja dikosongkan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Enzim Bromelin

Enzim bromelin merupakan enzim proteolitik atau protease, karena bertindak sebagai katalis dalam reaksi hidrolisis protein. Hidrolisis protein oleh enzim ini memecah protein menjadi molekul yang lebih kecil seperti asam amino dengan kombinasi air. Protease dalam enzim bromelin ini digolongkan ke dalam kelompok sulfhidril karena memiliki gugus sulfhidril pada lokasi aktif (Maryam, 2009). Selain itu, enzim bromelin disebut juga peptidase golongan endopeptidase, karena memecah ikatan pada rantai peptida dari dalam. Enzim bromelin termasuk dalam golongan glikoprotein. Glikoprotein ini merupakan protein yang mengandung satu bagian oligosakarida pada setiap molekul dan berikatan kovalen dengan polipeptida enzim. Deretan asam amino sekitar lokasi aktif enzim meliputi: -Cys-Gly-Ala-Cys-Trp-Asn-Gly-Asp-Pro-Cys-Gly-Ala-Cys-Cys-Trp, sehingga dari deret tersebut, sistein (Cys) menunjukkan lokasi aktifnya (Gautam, dkk., 2010).

Enzim bromelin terdapat pada tanaman nanas (*Ananas comosus*). Semua jaringan pada tanaman nanas ini mengandung enzim bromelin. Sekitar setengah dari protein dalam nanas merupakan enzim bromelin (Wuryanti, 2006). Pada setiap bagian tanaman nanas mengandung enzim bromelin dengan konsentrasi protease yang berbeda-beda. Begitu pula dengan tingkat pertumbuhan dan pematangan buah nanas, kadar protease yang diperoleh juga berbeda. Pada bagian daging buah nanas, didapatkan kandungan enzim bromelin lebih banyak yang ditandai dengan aktivitasnya yang tinggi daripada bagian batang (Supartono, 2004 dalam Maryam, 2009). Dari bagian tanaman nanas yang belum tua terutama yang banyak memiliki getah, kandungan enzim bromelin sangat sedikit (Herdyastuti, 2006 dalam Maryam, 2009). Berbeda dengan pendapat Hairi (2010) menyatakan bahwa enzim bromelin banyak terkandung dalam buah nanas muda daripada buah nanas yang matang. Perbedaan

dalam perolehan enzim bromelin tersebut dapat disebabkan karena jenis nanas yang berbeda. Pada Tabel 2.1 dijelaskan prosentase kandungan enzim bromelin pada bagian tanaman nanas.

Tabel 2.1. Kandungan enzim bromelin pada bagian tanaman nanas.

No	Bagian tanaman	Kadungan Bromelin (%)
1	Buah utuh matang	0,060 – 0,080
2	Buah utuh mentah	0,040 – 0,060
3	Daging buah matang	0,080 – 0,125
4	Daging buah mentah	0,050 – 0,070
5	Kulit buah	0,050 – 0,075
6	Tangkai	0,040 – 0,060
7	Batang	0,100 – 0,600

Sumber: Ferdiansyah (2005).

2.2. Isolasi Enzim Bromelin

Enzim Bromelin dapat diperoleh dengan cara mengisolasinya dari buah nanas. Beberapa penelitian telah melakukan isolasi enzim bromelin dari daging buah nanas. Cara isolasinya dengan pengendapan dan pemisahan.

2.2.1. Pengendapan Enzim dengan Amonium Sulfat

Isolasi enzim bromelin dilakukan dengan cara mengambil ekstrak cair dari daging buah nanas. Ekstrak cair nanas ditambahkan bahan pengendap untuk memperoleh ekstrak kasar enzim bromelin. Bahan pengendap yang digunakan yaitu larutan ammonium sulfat jenuh. Berdasarkan penelitian Salahudin (2011) yang membandingkan pengaruh bahan pengendap enzim bromelin, menyebutkan bahwa pengendapan enzim bromelin dengan ammonium sulfat mampu menghasilkan isolat enzim yang memiliki aktivitas, sedangkan pengendapan dengan alkohol tidak menghasilkan isolat enzim yang memiliki aktivitas. Pengendapan dengan ammonium sulfat dapat mengendapkan enzim tanpa bereaksi dengan protein dan polisakarida. Pada proses

pengendapan dengan alkohol dalam ekstrak cair nanas timbul panas yang membuat enzim inaktif. Timbulnya panas tersebut karena adanya reaksi pemutusan ikatan hidrogen antar molekul air dan terbentuknya ikatan hidrogen baru antara molekul air dengan alkohol yang bersifat eksotermis. Di samping itu, alkohol mempunyai gugus polar yang mampu menggumpalkan glikosida, sehingga terjadi denaturasi senyawa yang mengandung gugus glikosida lain seperti enzim bromelin (Winarno, 1982).

2.2.2. Pemisahan Enzim dengan Sentrifugasi

Proses sentrifugasi dilakukan untuk memisahkan enzim yang terendapkan oleh garam dan masih bercampur dengan larutannya. Pemisahan dengan sentrifugasi didasarkan bahwa partikel yang tersuspensi akan mengendap ke dasar wadah karena pengaruh gravitasi. Laju pengendapan dapat ditingkatkan dengan meningkatkan pengaruh gravitasi terhadap partikel yang dapat dilakukan dengan menempatkan tabung berisi suspensi sampel ke dalam rotor mesin sentrifugasi dan diputar dengan kecepatan tinggi (Yuwono, 2007). Pada pemisahan enzim, prinsip sentrifugasi didasarkan oleh massa dari partikel enzim. Laju pengendapan tersebut ditentukan oleh massa partikel dan perbedaan densitas antara partikel enzim dengan cairan. Dengan demikian, enzim akan terendapkan di dasar tabung sentrifugasi, sehingga mudah untuk dipisahkan.

2.3. Aktivitas Enzim

Enzim bertindak sebagai katalis yang mampu meningkatkan kecepatan reaksi dengan menurunkan energi aktivasi. Beberapa faktor yang memengaruhi keaktifan enzim bromelin antara lain kematangan buah, pH, suhu lingkungan, konsentrasi enzim dan lama proses, aktivitas air serta adanya inhibitor. Buah nanas yang semakin matang memiliki aktivitas semakin rendah. Hal ini berkaitan dengan pembentukan asam yang semakin banyak, sehingga menurunkan pH menjadi asam antara 3-3,5 di bawah titik isoelektriknya 4,6. Penurunan pH hingga di bawah titik isoelektrik buah yang matang menyebabkan

enzim terdenaturasi dan memengaruhi sifat ionik gugus karboksil dan gugus asam amino (Ferdiansyah, 2005).

Peningkatan suhu akan meningkatkan laju reaksi, baik reaksi yang tidak dikatalisis maupun yang dikatalisis enzim. Peningkatan laju tersebut dengan meningkatkan energi kinetik dan frekuensi tumbukan molekul-molekul yang bereaksi. Namun, suhu yang tinggi juga dapat merusak interaksi nonkovalen yang mempertahankan struktur tiga dimensi enzim. Rantai polipeptida enzim kemudian mulai terurai atau denaturasi (Murray, dkk., 2009). Selain itu, reaksi akan berjalan cepat dengan peningkatan konsentrasi enzim. Semakin tinggi konsentrasi enzim akan mempengaruhi banyaknya produk yang terbentuk oleh transformasi substrat. Selain itu, kecepatan reaksi juga akan meningkat karena perlakuan waktu yang diberikan untuk reaksi. Semakin lama waktu reaksi, maka produk yang dihasilkan akan semakin banyak. Pada saat enzim telah berada di titik optimumnya maka akan berpengaruh terhadap kecepatan reaksi yang mengakibatkan penurunan kecepatan.

2.4. Amobilisasi Enzim

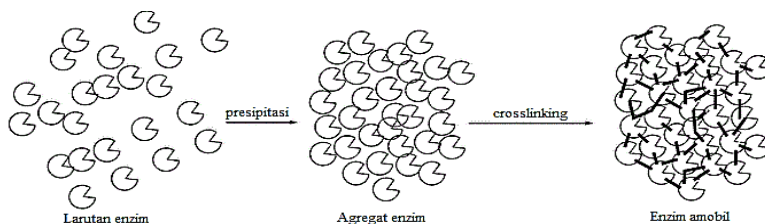
Dalam keadaan bebas, enzim dapat larut dalam air atau substrat yang akan didegradasi. Larutnya enzim dalam substrat protein tidak dapat dipisahkan kembali. Selain itu, bercampurnya enzim tersebut dapat memengaruhi kadar protein substrat dalam campuran. Sekarang ini telah banyak penelitian dengan enzim yang dijebak dalam padatan yang tidak larut dalam air. Penjebakan enzim ini mengakibatkan enzim tidak larut dalam air maupun substrat, namun masih tetap memiliki aktivitas proteolitiknya. Cara ini disebut dengan amobilisasi enzim. Dengan menggunakan cara amobilisasi enzim, kekurangan-kekurangan enzim dalam keadaan bebasnya dapat diminimalisir.

Teknik amobilisasi enzim memiliki beberapa keuntungan. Menurut Bayramolu, dkk. (2003) dan Krajewska (2004), diantara keuntungan amobilisasi enzim yaitu:

- a. Enzim amobil dapat digunakan kembali hingga beberapa kali.

- b. Enzim amobil lebih kuat dan tahan terhadap kondisi perubahan lingkungan.
- c. Pemisahan enzim dari larutan substrat lebih mudah karena enzim amobil tidak larut (bersifat heterogen).
- d. Larutan produk tidak terkontaminasi oleh enzim.
- e. Aplikasi dari enzim amobil dapat menurunkan biaya operasi.

Ada beberapa teknik yang dapat dilakukan untuk amobilisasi enzim, yaitu dapat secara fisik, kimia atau kombinasi fisik dan kimia. Metode amobilisasi berdasarkan Chibata (1978) dibagi tiga, meliputi metode pengikatan pada bahan pendukung (*carrier binding*), metode penjebakan (*entrapping*) dan metode ikat silang (*cross linking*). Metode *carrier binding* didasarkan pada pengikatan langsung enzim terhadap bahan pendukung yang tidak larut air melalui salah satu dari tiga cara meliputi adsorpsi fisik, pengikatan ionik dan pengikatan kovalen. Metode *entrapping* didasarkan pada penjebakan enzim dalam kisi polimer atau membran semipermeabel yang dapat dilakukan dengan tipe kisi atau mikroenkapsulasi. Metode *cross linking* menggunakan pereaksi pengikat silang untuk membentuk ikatan kovalen atau intramolekuler diantara molekul enzim, sehingga membentuk protein tiga dimensi yang stabil dan tidak larut dalam air. Pembentukan enzim amobil dengan metode *cross linking* dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1. Metode *cross linking* untuk amobilisasi enzim (Hanafeld, dkk., 2009).

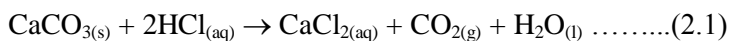
Metode *cross linking* didasarkan pada pembentukan ikatan kovalen antara molekul enzim oleh pereaksi bi- atau multifungsional sehingga menghasilkan jaringan protein tiga

dimensi yang stabil dan tidak larut dalam air. Pereaksi *cross linking* harus mempunyai dua gugus fungsional yang sama atau dapat pula dua atau lebih gugus fungsional yang berbeda (Kennedy, 1985). Pereaksi *cross linking* yang paling banyak digunakan untuk amobilisasi enzim adalah glutaraldehid. Glutaraldehid digunakan sebagai intermolekuler pereaksi *cross linking* untuk menghasilkan jaringan protein tiga dimensi yang stabil dan tidak larut air. Penggunaan glutaraldehid untuk amobilisasi enzim harus diperhatikan konsentrasinya. Seperti pereaksi aldehid lainnya, glutaraldehid dapat menghambat aktivitas enzim karena dapat bereaksi dengan gugus sulfhidril pada sisi aktif enzim (Goldstein dan Mannecke, 1976).

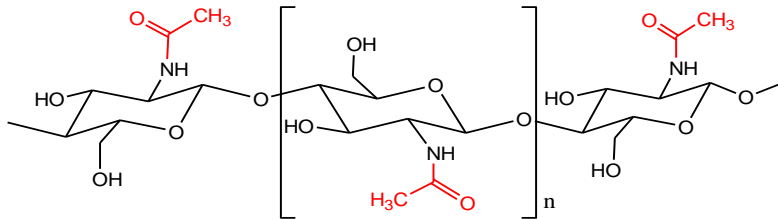
Amobilisasi enzim dengan glutaraldehid, dapat digunakan kitosan sebagai matriks pendukung. Kitosan memiliki gugus amina yang dapat bereaksi dengan glutaraldehid. Satu sisi glutaraldehid yang lain akan berikatan dengan gugus amino pada enzim sehingga terbentuk ikatan kitosan-glutaraldehid-enzim. Dalam formasi ikatan tersebut, glutaraldehid sebagai jembatan penghubung kitosan dan enzim.

2.5. Kitosan

Kitosan merupakan turunan utama dari kitin. Kitin dapat diperoleh dari kulit udang. Ada dua metode untuk isolasi kitin yaitu metode biologi dan metode kimia. Penelitian mengenai isolasi kitin umumnya dilakukan menggunakan metode kimia. Metode ini meliputi dua tahapan yaitu pemisahan mineral (demineralisasi) dan pemisahan protein (deproteinasi) yang terkandung dalam kulit udang. Proses demineralisasi dilakukan dengan merendam kulit udang dalam larutan HCl konsentrasi rendah. Reaksi yang terjadi pada proses demineralisasi seperti pada persamaan reaksi (2.1) dan (2.2).

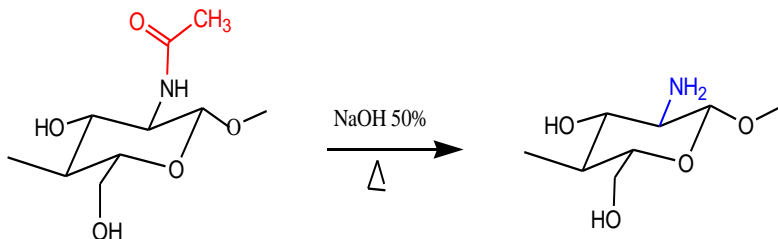


Proses deproteinasi menggunakan basa NaOH konsentrasi rendah. Protein akan lepas dan berikatan membentuk Na-proteinat yang dapat larut (Kuriasih dan Dwiasi, 2007). Beberapa penelitian menghendaki penambahan tahap *bleaching* atau *decoloration* untuk memperoleh kitin yang putih. Kitin yang diperoleh mempunyai struktur seperti pada Gambar 2.2.



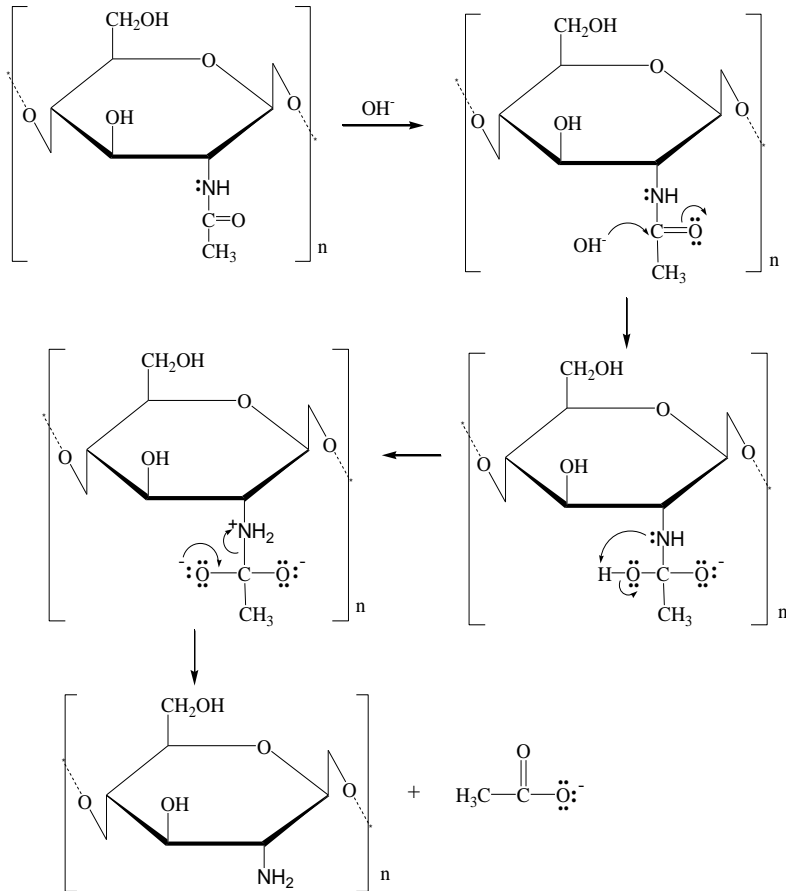
Gambar 2.2. Struktur kitin dengan gugus asetamida (Ramirez, dkk., 2010).

Transformasi kitin menjadi kitosan dilakukan dengan menghilangkan gugus asetilnya (deasetilasi). Proses deasetilasi ini menggunakan basa kuat NaOH dengan konsentrasi tinggi antara 45%-50% dengan pemanasan pada suhu kisaran 70-100 °C. Pada proses deasetilasi terjadi pemutusan ikatan kovalen antara gugus asetil dengan nitrogen pada gugus asetamida kitin, sehingga berubah menjadi gugus amina (-NH₂). Perubahan bentuk kitin menjadi kitosan dapat dilihat pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3. Transformasi kitin menjadi kitosan dengan proses deasetilasi menggunakan NaOH 50% (Lee, 2004).

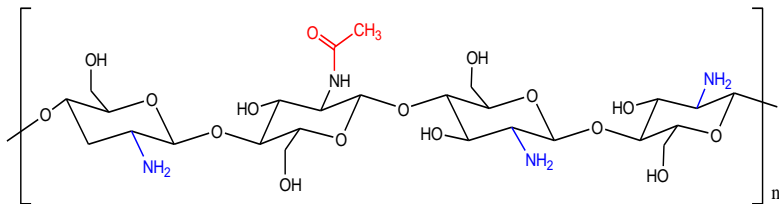
Proses deasetilasi melibatkan reaksi pemutusan gugus asetil pada kitin yang dijelaskan pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4. Reaksi pemutusan gugus asetil pada kitin hingga menjadi kitosan (Basuki dan Sanjaya, 2009).

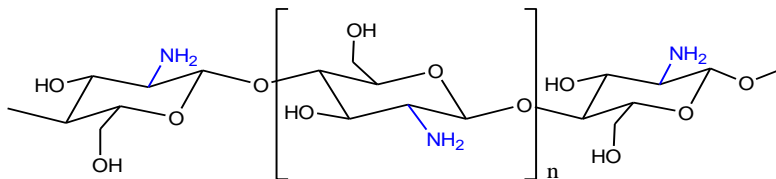
Hilangnya gugus asetil pada kitin dapat diketahui dengan menghitung derajat deasetilasi (%DD). Derajat deasetilasi dapat

diartikan sebagai perbandingan antara gugus amina ($-\text{NH}_2$) dengan gugus asetil ($-\text{OCH}_3$). Hal ini yang dapat membedakan kitin dan kitosan. Menurut Thate (2004) menyatakan bahwa kitosan memiliki derajat deasetilasi lebih dari 70%, sedangkan kitin kurang dari 70%. Nilai %DD mempengaruhi jumlah kitosan yang terbentuk. Semakin besar %DD maka kitosan yang terbentuk semakin mendekati kemurniannya. Derajat deasetilasi merupakan salah satu karakteristik kimia yang penting untuk kitosan karena akan mempengaruhi hasil aplikasi dari kitosan (Khan, dkk., 2002). Kitosan yang terdeasetilasi lebih dari 70% (belum sempurna) memiliki struktur seperti pada Gambar 2.5.



Gambar 2.5. Struktur kitosan yang terdeasetilasi lebih dari 70% dan belum sempurna (Thate, 2004).

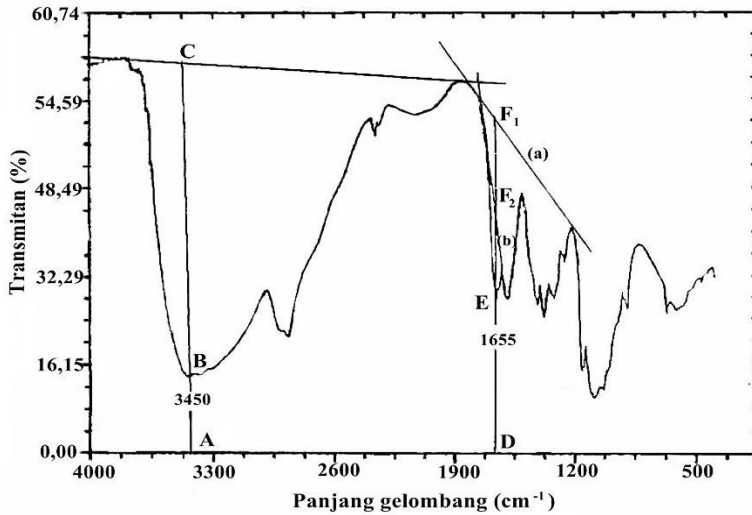
Kitosan yang terdeasetilasi sempurna memiliki struktur seperti pada Gambar 2.6, dimana seluruh gugus asetil digantikan dengan gugus amina.



Gambar 2.6. Struktur kitosan dengan gugus amina (Ramirez, dkk., 2010).

Derajat deasetilasi dari sampel kitosan dihitung berdasarkan rumus yang diusulkan oleh Domszy dan Roberts

(1985) menggunakan dua garis yang berbeda pada spektra IR kitosan seperti pada Gambar 2.7.



Gambar 2.7. Metode baseline untuk menghitung derajat deasetilasi (Khan, 2002).

Metode ini disebut metode *baseline*. Sesuai pada Gambar 2.7, *baseline* yang digunakan adalah *baseline* (a) dengan perhitungan seperti pada persamaan (2.3).

$$\% \text{ DD} = 100 - \left(\frac{A_{1655}}{A_{3450}} \times \frac{100}{1,33} \right) \dots\dots\dots(2.3)$$

Simbol A_{1655} adalah serapan pada panjang gelombang 1655 cm^{-1} yang merupakan amida dan A_{3450} adalah serapan pada panjang gelombang 3450 cm^{-1} yang merupakan hidroksida. Angka 1,33 merupakan faktor yang melambangkan nilai rasio dari A_{1655}/A_{3450} untuk kitosan yang terdeasetilasi sempurna (Domszy dan Roberts, 1985). Nilai dari A_{1655} dan A_{3450} dapat diketahui menggunakan rumus yang diusulkan oleh Sabnis dan Block (1997) sesuai persamaan (2.4) dan (2.5).

$$A_{1655} = \log \frac{DF_1}{DE} \dots\dots\dots(2.4)$$

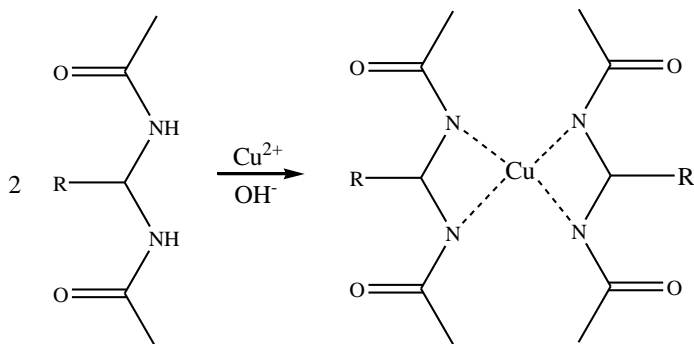
$$A_{3450} = \log \frac{AC}{AB} \dots\dots\dots(2.5)$$

2.6. Kasein

Susu mengandung beberapa protein, salah satu yang jumlahnya paling banyak adalah kasein sekitar 80%. Kasein terdapat dalam susu sebagai suatu suspensi koloidal partikel-partikel kompleks yang disebut misel (Soeparno, dkk., 2001). Kasein disebut juga sebagai kalsium fosfo kaseinat atau misel kasein, karena kasein didefinisikan sebagai kompleks senyawa protein dengan garam Ca, P dan sejumlah kecil Mg dan sitrat sebagai agregat makromolekul (Eksin, dkk., 1990). Kasein (*acid casein*) mempunyai kelarutan sangat rendah, diperoleh dari pengendapan protein susu bebas lemak pada kisaran pH 4,5 sampai 5,0. Kasein memiliki daerah hidrofobik dan hidrofilik yang berbeda sepanjang rantai protein. Ikatan hidrofobik yang dimiliki kasein adalah ikatan antar molekul dalam jumlah besar (Rukmini dan Nur, 2008).

2.7. Analisa Protein Metode Biuret

Penentuan kadar protein dapat ditetapkan secara kolorimetri. Salah satu metode kolorimetri yang digunakan adalah metode biuret. Prinsipnya didasarkan bahwa ikatan peptida dapat membentuk kompleks yang berwarna ungu dengan penambahan tembaga sulfat dalam suasana basa (Carprette, 2005). Di dalam reagen biuret terdiri dari campuran protein dengan larutan natrium hidroksida dan tembaga sulfat. Uji positif kandungan protein dalam sampel uji adalah terbentuknya warna ungu saat direaksikan dengan reagen biuret (Gambar 2.8). Spektrum absorbansi yang dihasilkan oleh suatu larutan protein dapat berbeda-beda. Hal ini dipengaruhi oleh pH dan susunan residu asam amino (Montgomery, 1993).



Gambar 2.8. Pembentukan kompleks ungu Cu-protein.

2.8. Spektrofotometri UV-Visible

Spektrofotometer UV-Visible (UV-Vis) adalah alat yang digunakan untuk analisa kimia kuantitatif, namun dapat juga digunakan untuk analisa semi kualitatif. Prinsip kerja alat ini didasarkan pada penyerapan sinar oleh spesi kimia di daerah sinar ultra violet (UV) dan sinar tampak (*visible*) (Huda, 2001). Bila cahaya putih yang berisi seluruh spektrum panjang gelombang melewati suatu medium seperti kaca atau suatu larutan kimia berwarna yang tembus cahaya bagi panjang gelombang tertentu tetapi menyerap panjang gelombang yang lain, medium itu akan tampak berwarna bagi pengamat. Gelombang yang hanya diteruskan yang sampai ke mata, panjang gelombang itulah yang menentukan warna medium. Warna ini dikatakan warna komplementer (Day dan Underwood, 2002). Warna komplementer dari spektrum cahaya tampak dapat dilihat pada Tabel 2.2.

Pada spektrofotometri UV-Vis, interaksi yang diamati adalah adanya absorbansi pada panjang gelombang tertentu di daerah UV-Vis oleh spesi kimia yang dianalisa. Dalam spektrofotometri UV-Vis dikenal hukum Lambert-Beer sebagaimana pada persamaan (2.6).

$$A = a.b.c \dots\dots\dots(2.6)$$

Absorbansi (A) berbanding lurus terhadap konsentrasi sampel (c). Simbol a merupakan suatu konstanta, sehingga apabila ketebalan sel (b) dibuat konstan maka nilai A hanya bergantung pada c . Jika beberapa nilai A dihubungkan dengan nilai c sesuai persamaan tersebut, maka akan diperoleh suatu kurva yang berbentuk garis lurus. Kurva inilah yang disebut sebagai kurva kalibrasi. Kurva kalibrasi ini digunakan untuk menentukan konsentrasi sampel yang sama dan pada panjang gelombang yang sama (Huda, 2001).

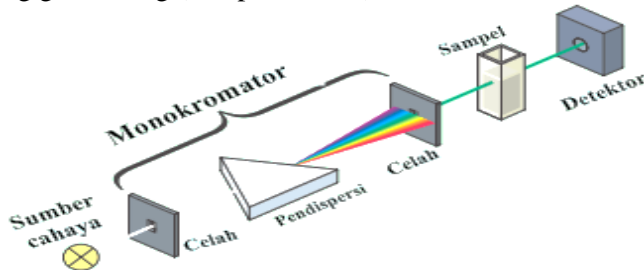
Tabel 2.2. Spektrum cahaya tampak dan warna komplementernya.

Panjang gelombang (nm)	Warna	Warna komplementer
400 – 435	Violet	Kuning-hijau
435 – 480	Biru	Kuning
480 – 490	Hijau-biru	Oranye
490 – 500	Biru-hijau	Merah
500 – 560	Hijau	Ungu
560 – 580	Kuning-hijau	Violet
580 – 595	Kuning	Biru
595 – 610	Oranye	Hijau-biru
610 – 750	Merah	Biru-hijau

Sumber: Day dan Underwood (2002).

Spektrofotometer UV-Vis tersusun dari komponen-komponen pokok yaitu sumber cahaya, monokromator, sel absorpsi dan detektor seperti dilihat pada Gambar 2.9. Sumber cahaya yang biasa digunakan adalah lampu deuterium yang dapat mengemisikan radiasi elektromagnetik pada daerah spektrum ultraviolet, Sumber sinar kedua adalah lampu tungsten yang digunakan untuk panjang gelombang pada daerah spektrum sinar tampak. Monokromator untuk mengubah cahaya polikromatis menjadi monokromatis. Bagian awal dan akhir monokromator terdapat celah (*slit*) yang berfungsi untuk memusatkan panjang gelombang yang diinginkan pada cuplikan (Mulja dan Suharman, 1995). Sel absorpsi atau disebut kuvet, pada pengukuran daerah

cahaya tampak menggunakan kuvet kaca, sedangkan untuk pengukuran daerah UV menggunakan kuvet kuarsa karena gelas tidak tembus cahaya pada daerah UV. Detektor penerima berfungsi memberikan respon terhadap cahaya pada berbagai panjang gelombang (Khopkar, 1990).



Gambar 2.9. Komponen spektrofotometer UV-Vis (Owen, 2000).

Prinsip kerja alat spektrofotometer UV-Vis yaitu suatu sumber cahaya dipancarkan melalui monokromator. Monokromator menguraikan sinar yang masuk dari sumber cahaya menjadi pita-pita panjang gelombang dan disesuaikan untuk pengukuran sampel. Cahaya yang telah melewati monokromator diteruskan dan diserap oleh sampel di dalam kuvet. Jumlah cahaya yang diserap oleh larutan akan menghasilkan sinyal elektrik pada detektor, dimana sinyal elektrik ini sebanding dengan cahaya yang diserap oleh sampel. Besarnya sinyal elektrik yang dialirkan ke pencatat dapat dilihat sebagai angka (Pecsok, dkk., 1976; Skoog dan West, 1971).

Ada beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam analisis menggunakan spektrofotometri UV-Vis, karena berhubungan dengan warna. Hal ini disampaikan oleh Glasston (1960), Pecsok dkk. (1976), serta Skoog dan West (1971) dalam Triyati (1985) sebagai berikut:

- a. Sebisanya mungkin warna yang dihasilkan stabil dalam jangka waktu yang lama.

- b. Sebaiknya menggunakan reaksi warna yang spesifik untuk unsur tertentu, sehingga adanya unsur lain tidak mengganggu dan tidak perlu dipisahkan.
- c. Sifat zat warna yang tahan terhadap kondisi terbuka, jika terjadi penguapan maka larutan akan menjadi pekat.
- d. Sifat zat warna yang sensitif apabila konsentrasi diperbesar maka larutan akan menjadi pekat.
- e. Digunakan larutan yang homogen agar cahaya mengabsorpsi pada bagian yang sama.

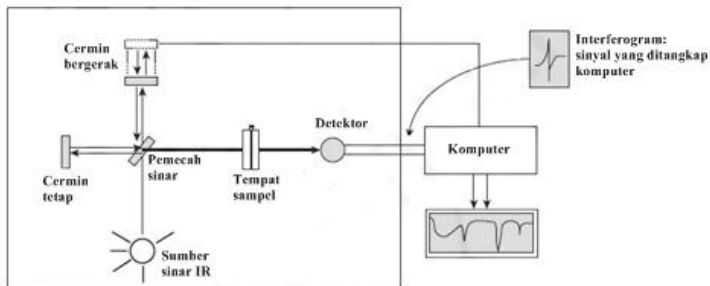
2.9. Spektrofotometri Fourier Transform Infrared (FTIR)

Spektrofotometri Infrared (IR) adalah metode pengamatan interaksi molekul dengan radiasi elektromagnetik pada bilangan gelombang $13.000 - 10 \text{ cm}^{-1}$ atau pada panjang gelombang $0,75 - 1.000 \text{ }\mu\text{m}$ (Giwangkara, 2007). Panjang gelombang IR lebih panjang sehingga energinya lebih rendah. Energi sinar IR berkaitan dengan energi vibrasi molekul (Noor, 2010). Umumnya, penggunaan sinar infra merah terbatas antara bilangan gelombang $4000 - 600 \text{ cm}^{-1}$. Namun, akhir-akhir ini telah digunakan daerah IR dekat yakni $14.290 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ dan daerah IR jauh yaitu $700 - 200 \text{ cm}^{-1}$ (Silverstein, dkk., 1986).

Spektrofotometri IR merupakan salah satu teknik yang paling sering digunakan untuk mendapatkan informasi struktur berbagai tipe senyawa. Spektra IR memberikan informasi mengenai gugus yang terdapat pada senyawa yang dianalisa. Spektrofotometri IR dapat digunakan untuk analisa kualitatif dan kuantitatif. Analisa kualitatif dilakukan dengan membandingkan spektrum sampel dengan standar dari sampel tersebut. Apabila sampel yang dianalisa sama dengan standar, maka posisi dan intensitas relatif dari puncak-puncak serapan akan sama. Analisa kuantitatif dilakukan seperti analisa pencemaran udara adanya karbon monoksida dalam udara dengan teknik *non-dispersive* (Khopkar, 2003). Analisa kuantitatif dalam spektrofotometri IR kurang akurat jika dibandingkan dengan teknik analisa kuantitatif yang lain, dan jarang dilakukan karena rumit.

Spektrofotometer IR ada dua jenis yaitu spektrofotometer dispersif dan spektrofotometer FTIR. Pada spektrofotometer dispersif, monokromator untuk masuknya sinar memiliki celah yang kecil sehingga membatasi panjang gelombang radiasi mencapai detektor. Pada spektrofotometer FTIR, monokromator diganti dengan interferometer yang mampu mengatur intensitas sumber sinar IR dengan mengubah posisi cermin pemantul sinar, sehingga spektrofotometer FTIR mampu mengukur intensitas sampel secara serentak (Stuart, 2004).

Komponen spektrofotometer FTIR ditunjukkan pada Gambar 2.10. Spektrofotometer FTIR didasarkan pada adanya radiasi antara dua berkas sinar untuk menghasilkan suatu interferogram yang merupakan sinyal yang dihasilkan sebagai fungsi perubahan jarak yang ditempuh antara dua berkas sinar. Radiasi yang berasal dari sumber sinar dilewatkan melalui interferometer menuju sampel sebelum akhirnya mencapai detektor. Selama proses amplifikasi (penguatan) sinyal berlangsung dimana pengaruh frekuensi tinggi telah dihilangkan dengan adanya filter, maka data diubah ke bentuk digital dengan suatu *analog-to-digital converter* dan dipindahkan ke komputer untuk menjalani transformasi *fourier* (Pavia, dkk., 2009).



Gambar 2.10. Komponen spektrofotometer FTIR (Pavia, dkk., 2009).

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Alat dan Bahan

3.1.1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain spektrofotometer UV-Vis (Optima SP-300 Spectrofotometer), FTIR (Shimadzu FTIR-8400S), pH meter, *sentrifuge*, *freeze dryer*, *freezer*, *shaker*, *magnetic stirrer*, *hot plate*, oven, neraca analitik, termometer, kertas saring, beaker gelas, erlenmeyer, gelas ukur, labu ukur, cawan petri, botol timbang, kaca arloji, pipet tetes, spatula dan peralatan gelas lainnya.

3.1.2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain buah nanas dari Pasar Keputran Surabaya, kulit udang laut dari Pasar Pabean Surabaya, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, HCl, NaOH, glutaraldehid, kasein, reagen biuret dan aquades.

3.2. Prosedur Penelitian

3.2.1. Isolasi Kitin

Kitin diisolasi dari kulit udang laut dari Pasar Pabean Surabaya. Udang dikuliti dan dicuci hingga bersih. Kulit udang dikeringkan dibawah sinar matahari. Kulit udang yang telah kering, dihaluskan menggunakan blender kemudian diayak hingga diperoleh bentuk serbuk. Kitin diperoleh melalui dua tahap demineralisasi dan deproteinasi yang mengacu dari penelitian Kumari dkk (2015) dengan beberapa modifikasi.

3.2.1.1. Demineralisasi Kitin

Serbuk kulit udang ditambahkan HCl 1 M dengan perbandingan 1:15 (b/v) sambil diaduk kemudian didiamkan selama 2 jam. Residu disaring kemudian dicuci dengan aquades hingga pH netral. Selanjutnya, residu yang masih basah dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C selama 4 jam.

3.2.1.2. Deproteinasi Kitin

Serbuk kitin hasil demineralisasi selanjutnya direndam dalam NaOH 1 M dengan perbandingan 1:10 (b/v). Campuran tersebut didiamkan pada suhu ruang selama 18 jam. Perendaman dalam NaOH 1 M dilakukan hingga larutan tidak berwarna. Residu disaring kemudian dicuci dengan aquades hingga pH netral. Residu yang masih basah dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C selama 4 jam.

3.2.2. Transformasi Kitin menjadi Kitosan

Kitin dilakukan proses deasetilasi menjadi kitosan. Dalam proses ini, kitin ditambahkan NaOH 50% dengan perbandingan 1:10 (b/v), kemudian diaduk sambil dipanaskan dalam penangas air mendidih pada suhu 100°C selama 4 jam. Residu dipisahkan kemudian dicuci dengan aquades hingga pH netral. Residu yang masih basah dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C selama 4 jam.

3.2.3. Penentuan Kadar Protein

3.2.3.1. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Kadar protein ditentukan menggunakan metode biuret. Pertama, ditentukan panjang gelombang maksimum dari larutan stok kasein 5000 ppm yang dibuat dari 500 mg kasein dilarutkan dalam campuran larutan NaOH 0,4 M sebanyak 25 mL dan aquades 75 mL. Pengukuran absorbansi menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dilakukan dengan cara 6 mL kasein 5000 ppm ditambahkan dengan 4 mL reagen biuret, kemudian diaduk dan didiamkan selama 20 menit pada suhu 37°C. Larutan standar kasein diukur absorbansinya pada range panjang gelombang antara 500-600 nm dengan interval 5 nm. Pembuatan blanko menggunakan aquades 6 mL dan ditambahkan 4 mL reagen biuret serta dilakukan perlakuan yang sama seperti sampel kasein. Data pengukuran dibuat grafik antara panjang gelombang (λ) terhadap absorbansi (A) hingga diketahui panjang gelombang maksimum kasein yang terabsorpsi paling besar.

3.2.3.2. Pembuatan Kurva Standar Kasein

Kurva standar kasein dibuat dari larutan stok kasein 5000 ppm yang diambil volumenya 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 dan 5,0 mL dan ditambah 4 mL reagen biuret dan ditambahkan aquades hingga volume total 10 mL. Dilakukan perbedaan volume kasein untuk memperoleh konsentrasi larutan kasein secara berturut-turut 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750, 2000, 2250, 2500, 2750 dan 3000 ppm. Larutan diaduk dan didiamkan selama 20 menit pada suhu 37°C. Larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh sebelumnya. Data pengukuran absorbansi dibuat kurva antara konsentrasi terhadap absorbansi dan ditentukan persamaan garis dari regresi linier.

3.2.4. Isolasi Enzim Bromelin

Enzim Bromelin diisolasi dari buah nanas dari Pasar Keputran Surabaya. Sebanyak 500 gram buah nanas dihaluskan menggunakan blender, kemudian disaring dan diperas menggunakan kain hingga diperoleh sarinya. Sari buah nanas disentrifugasi selama 25 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Supernatan diambil sebanyak 80 mL dan diendapkan dengan menambahkan larutan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ jenuh sebanyak 20 mL (untuk memperoleh fraksi pengendapan 20%), kemudian didinginkan dalam lemari es semalam. Setelah terbentuk endapan, dilakukan sentrifugasi selama 25 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Endapan diambil dan disimpan di dalam *freezer* kemudian dikeringkan menggunakan *freeze dryer*. Pengendapan diulangi untuk memperoleh fraksi pengendapan 30%, 40%, 50% dan 60%. Enzim ditentukan aktivitas katalitiknya dengan melarutkan 5 mg dalam 10 mL substrat kasein 3000 ppm, kemudian dihomogenkan dengan *shaker* selama 1 jam dengan kecepatan 120 rpm pada suhu ruang. Selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum dengan cara diambil sebanyak 6 mL larutan substrat-enzim dan ditambahkan 4 mL reagen biuret kemudian dibiarkan selama 20 menit pada suhu 37°C.

3.2.5. Amobilisasi Enzim Bromelin

3.2.5.1. Pengaruh Konsentrasi Kitosan terhadap Aktivitas Enzim

Amobilisasi bromelin dilakukan dengan variasi pada kitosan. Penambahan kitosan divariasi mulai dari 50, 100, 150, 200 dan 250 mg. Enzim bromelin sebanyak 50 mg dimasukkan ke dalam 3,6 mL larutan buffer fosfat pH 6 dan ditambahkan kitosan dengan lima variasi, kemudian didiamkan selama 15 menit dalam lemari es. Campuran ditambahkan 0,4 mL glutaraldehid 5% dan didiamkan 30 menit pada suhu ruang. Campuran disimpan dalam lemari es selama 18 jam. Enzim amobil yang terbentuk disaring dan dicuci dengan 30 mL aquades. Filtrat air cucian enzim diencerkan hingga 50 mL dan ditentukan kandungan proteinnya yang menandakan jumlah enzim yang tidak teramobil. Selanjutnya, enzim amobil diambil 10 mg setiap variasi dan diuji aktivitasnya dengan substrat kasein 3000 ppm.

3.2.5.2. Pengaruh Konsentrasi Bromelin terhadap Aktivitas Enzim

Prosedur dilakukan sama seperti pada amobilisasi variasi kitosan dengan menggunakan konsentrasi kitosan optimum yang diperoleh dari percobaan. Hanya saja pada tahap ini, amobilisasi dilakukan dengan variasi konsentrasi enzim. Enzim bromelin yang ditambahkan mulai dari 10, 30, 50, 70 dan 90 mg. Setelah enzim amobil terbentuk, kemudian disaring dan dicuci dengan larutan 30 mL aquades. Filtrat air cucian enzim diencerkan hingga 50 mL dan ditentukan kandungan proteinnya yang menandakan jumlah enzim yang tidak teramobil. Kemudian enzim amobil diambil 10 mg setiap variasi dan diuji aktivitasnya dengan substrat kasein 3000 ppm.

3.2.6. Pengaruh Konsentrasi Substrat terhadap Aktivitas Enzim Bromelin Amobil

Enzim bromelin yang telah diamobilisasi ditentukan aktivitasnya terhadap pengaruh konsentrasi substrat. Substrat kasein yang ditambahkan dari 1000, 2000 dan 3000 ppm. Masing-

masing substrat diambil sebanyak 10 mL. Enzim bromelin amobil 10 mg dimasukkan ke dalam larutan substrat dan dihomogenkan dengan *shaker* kecepatan 120 rpm pada suhu ruang selama 2 jam. Enzim bromelin amobil dipisahkan dari larutan substrat. Filtrat yang telah dipisahkan ditentukan kadar protein terdegradasi dengan diambil sebanyak 6 mL larutan filtrat ditambah 4 mL reagen biuret dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit, kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum.

3.2.7. Pengaruh Perulangan Penggunaan Enzim Bromelin Amobil terhadap Aktivitas Enzim

Enzim bromelin amobil yang digunakan secara berulang ditentukan aktivitas katalitiknya dengan substrat kasein 3000 ppm 10 mL dengan waktu inkubasi 2 jam. Enzim bromelin amobil 20 mg dimasukkan ke dalam larutan uji pertama kemudian disaring dan dibilas dengan aquades sekali, kemudian langsung dimasukkan ke dalam larutan uji kedua hingga larutan uji keenam dengan perlakuan yang sama. Selanjutnya ditentukan kadar protein terdegradasi dan aktivitas enzim pada setiap perulangan.

Halaman ini sengaja dikosongkan.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Isolasi Kitin

Kitin diisolasi dari kulit udang laut melalui tahap demineralisasi dan deproteinasi. Sebelum melalui tahapan tersebut, kulit udang dijemur dibawah sinar matahari hingga kering dan dihaluskan hingga diperoleh bentuk serbuk, kemudian dilakukan tahapan selanjutnya. Kulit udang sebelum dan sesudah dihaluskan menjadi serbuk dapat dilihat seperti Gambar 4.1.



Gambar 4.1. Kulit udang (a) sebelum dihaluskan dan (b) serbuk.

4.1.1. Demineralisasi

Demineralisasi dilakukan untuk memisahkan kitin dalam kulit udang dari mineral utamanya yaitu CaCO_3 dan $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ dalam jumlah kecil. Mineral-mineral tersebut akan bereaksi dengan HCl sehingga terlepas dari kulit udang. Dari persamaan reaksi (2.1) diketahui hasil reaksi terbentuk gas CO_2 . Hal ini terlihat pada saat larutan HCl baru dicampurkan dengan serbuk kulit udang. Gelembung-gelembung gas seperti busa berwarna coklat terbentuk di permukaan campuran. Hasil demineralisasi kulit udang yang telah kering diperoleh serbuk coklat. Setelah dilakukan proses demineralisasi, terjadi pengurangan massa dari kulit udang 15 g menjadi 3 g serbuk. Kulit udang yang telah dilakukan demineralisasi dapat dilihat pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2. Serbuk kulit udang hasil demineralisasi.

4.1.2. Deproteinasi

Deproteinasi dilakukan untuk memisahkan protein yang masih bercampur dengan kitin. Kandungan protein yang terdapat pada serbuk kulit udang sebagian berikatan kovalen dengan kitin dan berikatan fisik dari sisa-sisa daging pada kulit. Protein dipisahkan dengan melarutkannya menggunakan basa NaOH, sehingga protein akan berikatan membentuk Na-proteinat yang dapat larut. Proses deproteinasi dilakukan dengan perendaman NaOH konsentrasi rendah dan pada suhu ruang untuk menghindari terjadinya deasetilasi kitin. Perulangan perendaman NaOH diulangi hingga larutan rendaman bening. Hal ini berfungsi sebagai penghilang warna untuk memperoleh serbuk kitin meskipun terlihat sedikit kecoklatan. Dengan perulangan perendaman NaOH tersebut, maka tidak perlu dilakukan untuk tahap *bleaching*. Proses deproteinasi menyebabkan pengurangan massa serbuk kitin dari 3 g menjadi 2,5 g. Kitin setelah tahap deproteinasi dilihat seperti Gambar 4.3.



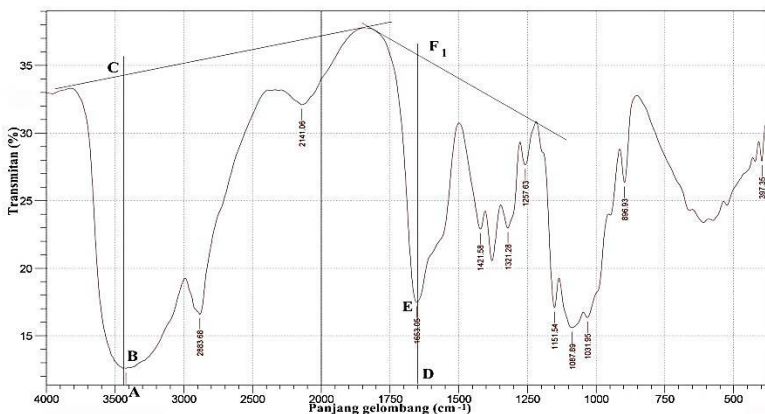
Gambar 4.3. Serbuk kitin hasil deproteinasi.

Setelah melalui tahap demineralisasi dan deproteinasi, rendemen serbuk kitin diperoleh sebesar 2,5 gram yaitu setara dengan 16,66% dari massa awal 15 gram. Hasil ini tidak sesuai

dengan Gildberg dan Stenberg (2001) yang mengemukakan bahwa kulit udang menghasilkan kitin sebesar 25-30%. Berbeda dengan Marganov (2003) yang menyatakan bahwa komponen kulit udang terdiri dari kitin 15-30%, protein 25-40% dan mineral 45-50%, dan besarnya prosentase tersebut dapat berbeda-beda tergantung pada jenis udangnya. Dengan demikian, tidak dipermasalahkan untuk hasil prosentase rendemen kitin yang berbeda karena dilakukan isolasi dari udang yang berbeda.

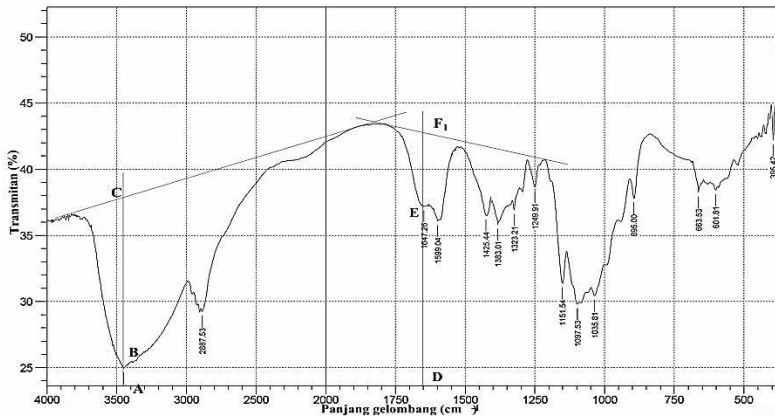
4.2. Transformasi Kitin menjadi Kitosan

Kitin ditransformasi menjadi kitosan melalui proses deasetilasi, yaitu mengganti gugus asetil pada kitin menjadi gugus amina. Hilangnya gugus asetil kitin dapat dihitung dari analisa spektra IR dengan metode *baseline*. Perhitungan metode *baseline* didasarkan pada persamaan (2.3) dengan mencari nilai A_{1655} dan A_{3450} dari persamaan (2.4) dan (2.5). Dari perhitungan metode *baseline*, diketahui derajat deasetilasi yang dapat menentukan sampel serbuk tersebut apakah masih tergolong kitin atau kitosan. Spektra IR hasil deasetilasi kitin ditunjukkan pada Gambar 4.4.



Gambar 4.4. Spektra hasil deasetilasi kitin pertama dengan panjang $DF_1 = 8,8$ cm; $DE = 2,2$ cm; $AC = 8,2$ cm dan $AB = 0,5$ cm.

Hasil deasetilasi pertama diperoleh %DD sebesar 62,75% dengan metode *baseline* pada Gambar 4.4. Hasil ini belum mencukupi untuk disebut sebagai kitosan, karena berdasarkan pernyataan Thate (2004) kitosan mempunyai %DD lebih dari 70%. Oleh sebab itu, dilakukan perulangan proses deasetilasi. Spektra IR hasil perulangan deasetilasi kitin ditunjukkan pada Gambar 4.5.



Gambar 4.5. Spektra kitosan hasil perulangan deasetilasi dengan panjang $DF_1 = 6,7$ cm; $DE = 4,7$ cm; $AC = 4,9$ cm dan $AB = 0,5$ cm.

Hasil perulangan deasetilasi diperoleh %DD sebesar 88,32% yang dapat dilihat pada Gambar 4.5. Hasil ini telah mencukupi untuk dikatakan sebagai kitosan karena lebih dari 70%.



Gambar 4.6. Serbuk kitosan.

4.3. Penentuan Kadar Protein

4.3.1. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Penentuan kadar protein digunakan untuk mengetahui besarnya protein terlarut. Penentuannya dilakukan secara kolorimetri dengan metode biuret. Protein yang digunakan adalah kasein. Larutan stok kasein dibuat dengan melarutkan 500,1 mg serbuk kasein dalam 25 mL NaOH 0,4 M dan sedikit aquades, karena kasein dapat larut dalam suasana basa. Setelah kasein larut sempurna, kemudian diencerkan hingga volume mencapai 100 mL, sehingga konsentrasi larutan kasein adalah 5001 ppm.

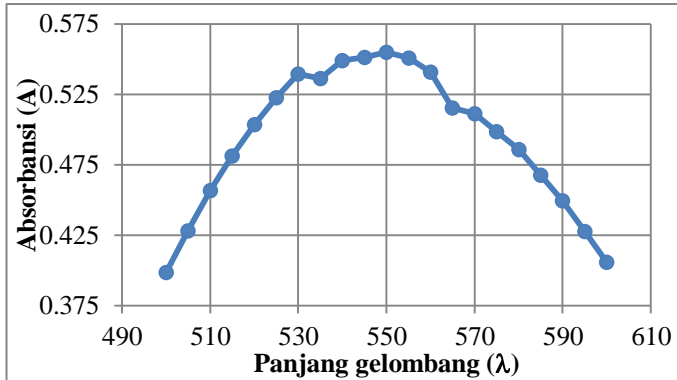
Larutan kasein ini bening (tidak berwarna), sehingga untuk menentukan panjang gelombang maksimumnya, dibutuhkan reagen yang dapat memberikan warna pada kasein. Sebanyak 6 mL kasein 5001 ppm yang ditambahkan 4 mL reagen biuret menghasilkan warna larutan menjadi ungu seperti terlihat pada Gambar 4.7. Hal ini disebabkan oleh ikatan peptida yang dapat membentuk kompleks dengan Cu^{2+} dalam suasana basa. Cu^{2+} terdapat dalam komposisi reagen biuret dari CuSO_4 bersama larutan basa NaOH. Dengan demikian, larutan kasein dapat diukur absorbansinya dengan Spektrofotometer UV-Visibel.



Gambar 4.7. Larutan blanko (biru muda) dan kasein (ungu) yang telah ditambahkan reagen biuret.

Pengukuran absorbansi larutan kasein didahului oleh pengukuran absorbansi blanko untuk kalibrasi. Range panjang gelombang untuk mengukur absorbansi ditentukan dari 500-600 nm dengan interval 5 nm. Data absorbansi dari range panjang gelombang 500-600 nm disajikan pada Gambar 4.8 dan untuk

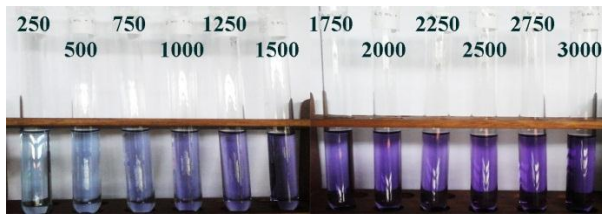
rincian data dapat dilihat pada Lampiran D. Panjang gelombang maksimum ditentukan pada pengukuran absorbansi yang paling tinggi, sehingga panjang gelombang maksimum untuk larutan kasein adalah 550 nm.



Gambar 4.8. Kurva absorbansi kasein pada 500-600 nm.

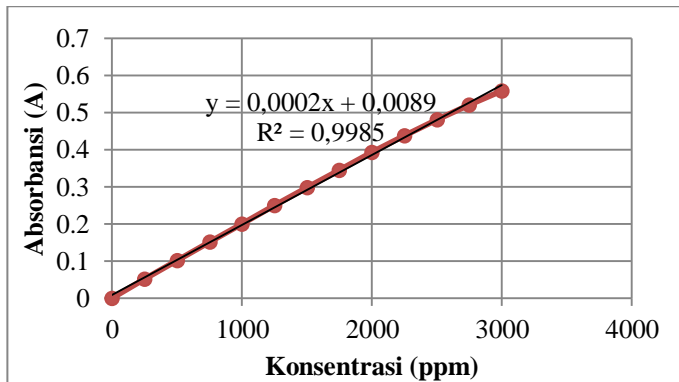
4.3.2. Pembuatan Kurva Standar

Kurva standar kasein digunakan sebagai pedoman dalam penentuan protein terlarut pada percobaan sampel selanjutnya. Pada grafik kurva standar dapat diketahui hubungan antara konsentrasi dengan absorbansi sampel. Melalui hubungan konsentrasi dengan absorbansi tersebut akan diperoleh persamaan yang dapat digunakan untuk menghitung konsentrasi sampel yang belum diketahui konsentrasinya. Kurva standar kasein dibuat dari larutan stok kasein 5001 ppm yang dibuat menjadi larutan dengan konsentrasi yang bervariasi secara berturut-turut 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750, 2000, 2250, 2500, 2750 dan 3000 ppm. Penambahan reagen biuret dilakukan untuk memberikan warna larutan sehingga dapat diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum 550 nm. Gambar 4.9 merupakan larutan kasein dengan variasi konsentrasi yang telah dibuat, dimana semakin tinggi konsentrasi warna larutan akan semakin pekat.



Gambar 4.9. Larutan kasein yang ditambah reagen biuret dari kiri ke kanan konsentrasi semakin meningkat.

Penentuan kurva standar kasein dilakukan dengan menghubungkan konsentrasi larutan kasein dengan absorbansi hasil pengukuran, sehingga terbentuk kurva seperti pada Gambar 4.10. Data pengukuran absorbansi dimuat dalam Lampiran E.



Gambar 4.10. Kurva standar kasein.

Berdasarkan kurva pada Gambar 4.10, semakin tinggi konsentrasi kasein, maka absorbansi yang dihasilkan semakin besar. Masing-masing titik pertemuan antara konsentrasi dengan absorbansi dihubungkan satu sama lain dan diteruskan hingga titik nol. Persamaan kurva standar kasein diperoleh pada persamaan (4.1).

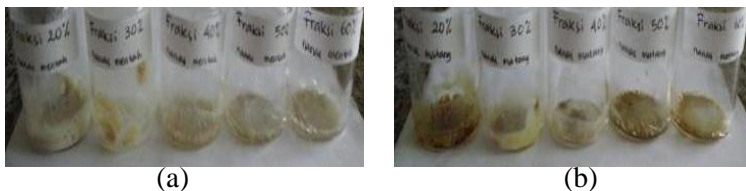
$$y = 0,0002x + 0,0089 \quad \dots\dots\dots(4.1)$$

Dengan memasukkan hasil pengukuran absorbansi larutan sebagai y pada persamaan (4.1), maka x sebagai konsentrasi larutan yang dicari akan dapat diketahui.

4.4. Isolasi Bromelin

Enzim bromelin dari buah nanas diisolasi dengan cara mengendapkannya dari ekstrak nanas dengan amonium sulfat jenuh. Ekstrak nanas didapatkan dengan menghaluskan daging buah nanas, kemudian diambil air perasannya dan disentrifugasi untuk memisahkan ampas yang masih bercampur dengan air perasan, sehingga diperoleh larutan ekstrak nanas yang kuning jernih. Buah nanas yang digunakan dua macam, yaitu nanas mentah dan nanas matang. Kedua nanas diekstrak untuk diambil enzim bromelinnya dan dibandingkan nanas mana yang memiliki aktivitas enzim lebih baik. Enzim dengan aktivitas tertinggi akan digunakan untuk perlakuan selanjutnya.

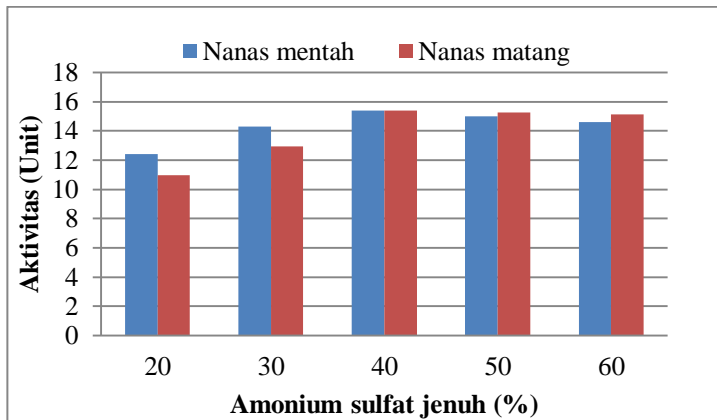
Pengendapan dengan amonium sulfat jenuh dilakukan secara bertingkat dari 20%, 30%, 40%, 50% hingga 60% dalam ekstrak nanas. Endapan yang terbentuk dipisahkan menggunakan sentrifugasi. Dari pengendapan bertingkat didapatkan beberapa endapan fraksi enzim bromelin yang masih basah. Fraksi enzim bromelin dikeringkan menggunakan *freeze dryer*. Masing-masing fraksi enzim bromelin ditentukan kadar protein enzim dan aktivitas proteolitiknya dalam larutan substrat menggunakan metode biuret.



Gambar 4.11. Fraksi enzim pengendapan ammonium sulfat jenuh 20%-60% dari kiri ke kanan, (a) nanas mentah, (b) nanas matang.

Penentuan aktivitas fraksi enzim bromelin dilakukan dengan mencampurkan enzim tersebut ke dalam substrat kasein 3000 ppm, dimana enzim akan mendegradasi substrat. Besarnya sisa protein yang tidak terdegradasi akan ditentukan kadarnya. Data absorbansi yang diperoleh dimasukkan ke dalam persamaan (4.1), sehingga konsentrasi dari protein sisa akan diketahui. Hasil konsentrasi protein sisa dikurangi dengan massa enzim yang ditambahkan, sebab dalam campuran substrat juga terdapat enzim. Selanjutnya dapat dihitung besarnya aktivitas dari masing-masing enzim bromelin.

Besarnya aktivitas enzim dihitung dalam satuan Unit. Pada penelitian ini, definisi untuk 1 Unit aktivitas enzim yaitu banyaknya μg protein yang terdegradasi/ menit/ mg enzim. Perhitungan aktivitas fraksi enzim disusun pada Lampiran F. Aktivitas dari fraksi enzim hasil pengendapan ammonium sulfat jenuh baik dari nanas mentah maupun nanas matang ditunjukkan pada Gambar 4.12.



Gambar 4.12. Aktivitas fraksi enzim pengendapan ammonium sulfat jenuh.

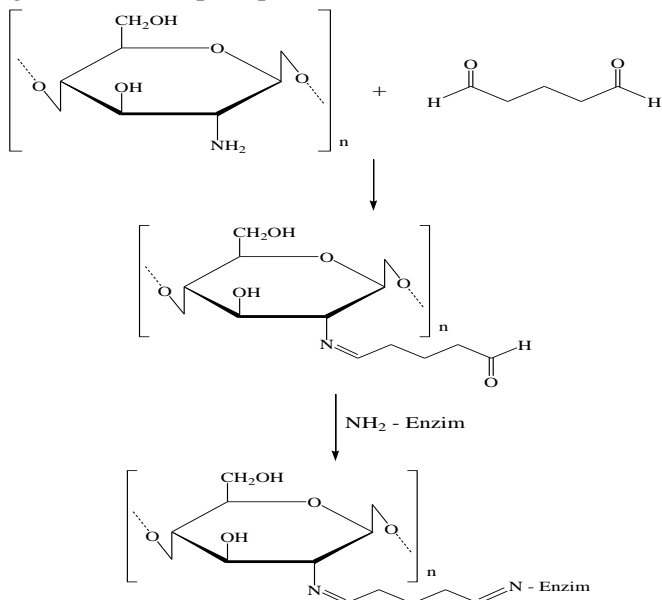
Pada Gambar 4.12 aktivitas enzim tertinggi diamati pada pengendapan ammonium sulfat jenuh 40% nanas mentah maupun

nanas matang sebesar 15,4082 Unit. Kedua jenis nanas diperoleh aktivitas optimum pada fraksi enzim 40% dikarenakan data yang diperoleh pada saat pengukuran absorbansi bernilai sama, sehingga aktivitas yang diperoleh juga sama. Dalam penelitian ini aktivitas bromelin dari kedua jenis nanas tersebut tidak berbeda jauh. Keduanya mempunyai aktivitas maksimum pada pengendapan ammonium sulfat jenuh 40%. Percobaan selanjutnya digunakan enzim dari nanas mentah dari pengendapan ammonium sulfat jenuh 40%.

4.5. Amobilisasi Enzim Bromelin

4.5.1. Pengaruh Konsentrasi Kitosan terhadap Aktivitas Enzim

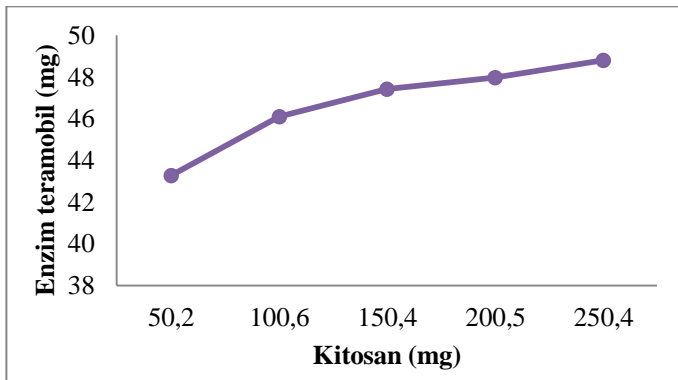
Amobilisasi enzim bromelin dilakukan dengan metode *cross linking*. Enzim akan berikatan silang dengan matriks pendukung kitosan yang diaktifkan oleh pereaksi *cross linking* yaitu glutaraldehid seperti pada Gambar 4.13.



Gambar 4.13. Amobilisasi enzim dengan matriks kitosan.

Pereaksi glutaraldehyd ini digunakan untuk menghubungkan pengikatan kitosan dengan enzim, karena enzim dan kitosan tidak dapat berikatan secara langsung (Miao dan Swee, 2000 dalam Ferdiansyah, 2005). Gugus aldehid pada glutaraldehyd akan berikatan dengan gugus amina pada kitosan dan gugus amino pada enzim, sehingga membentuk formasi kitosan-glutaraldehyd-enzim.

Penambahan kitosan untuk amobilisasi dilakukan dengan lima variasi. Masing-masing dari variasi kitosan diberikan enzim dengan jumlah yang sama besar yaitu 50 mg. Dengan dilakukannya variasi tersebut, dapat diketahui pengaruh konsentrasi kitosan terhadap jumlah enzim yang teramobil. Hasil amobilisasi enzim dengan variasi kitosan dilihat pada Gambar 4.14.

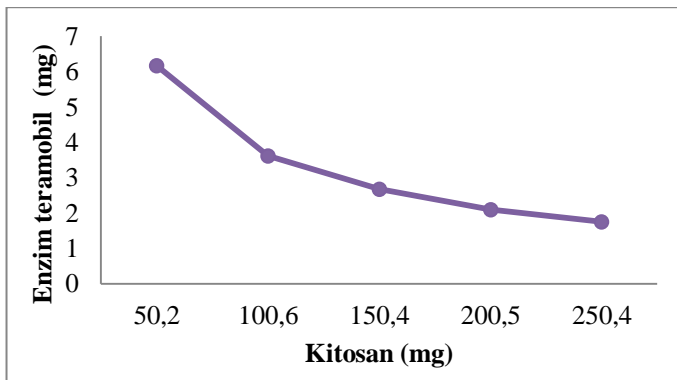


Gambar 4.14. Pengaruh konsentrasi kitosan terhadap enzim yang teramobil.

Berdasarkan Gambar 4.14 dapat diketahui semakin banyak kitosan yang diberikan maka semakin meningkat jumlah enzim yang teramobil. Jumlah enzim yang teramobil tersebut merupakan enzim terdapat dalam massa total (dengan matriks kitosan) yang diperoleh, dimana semakin banyak kitosan maka massa total enzim amobil diperoleh semakin besar. Oleh sebab itu,

pengukuran aktivitas enzim dilakukan dengan menggunakan massa enzim amobil yang sama besar.

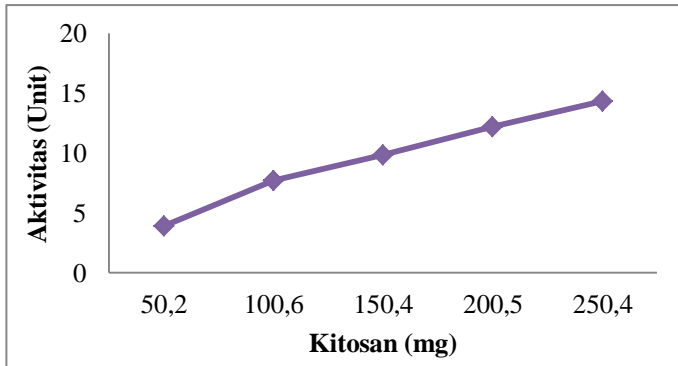
Masing-masing enzim amobil variasi kitosan diambil 10 mg massa totalnya, sehingga diketahui jumlah enzim teramobil per 10 mg yang diperlihatkan dalam Lampiran G, Tabel G.2. Dalam 10 mg massa total, didapatkan jumlah enzim teramobil seperti pada Gambar 4.15.



Gambar 4.15. Jumlah enzim teramobil dalam 10 mg massa total enzim amobil.

Jumlah enzim teramobil dalam 10 mg massa totalnya didapatkan hasil yang paling rendah pada kitosan 250,4 mg. Hal ini dikarenakan perlakuan kitosan yang semakin meningkat menghasilkan massa total enzim amobil yang semakin meningkat dengan enzim yang ditambahkan berjumlah sama, sehingga dalam 10 mg massa totalnya jumlah enzim teramobil akan semakin menurun.

Aktivitas enzim diukur dari 10 mg massa total enzim amobil variasi kitosan yang dimasukkan ke dalam substrat. Hasil pengujian aktivitas enzim amobil yang diambil sama banyak 10 mg dapat dilihat pada Gambar 4.16.



Gambar 4.16. Aktivitas enzim amobil variasi konsentrasi kitosan.

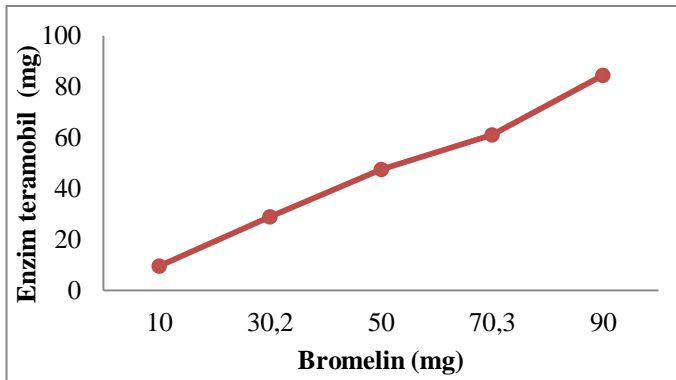
Aktivitas tertinggi enzim amobil terdapat pada perlakuan kitosan 250,4 mg, dimana jumlah enzim teramobil adalah yang paling rendah (dalam 10 mg massa total enzim amobil yang diuji). Sebaliknya pada perlakuan kitosan 50,2 mg diperoleh aktivitas paling rendah. Jumlah enzim teramobil dan aktivitas enzim dapat dihubungkan bahwa semakin tinggi jumlah enzim teramobil maka semakin rendah aktivitasnya. Dalam penelitian Zhu dan Sun (2012) didapatkan jumlah enzim teramobil tinggi menghasilkan aktivitas rendah yang dipengaruhi oleh pereaksi glutaraldehid. Hal tersebut dikarenakan enzim melekat erat dengan konformasi yang tepat sehingga kehilangan fleksibilitas fungsi katalitiknya. Selain itu, banyaknya jumlah enzim yang teramobil pada permukaan matriks dapat mendorong halangan sterik intermolekuler dan menyebabkan terhambatnya pertemuan substrat dengan sisi aktif enzim.



Gambar 4.17. Enzim bromelin teramobilisasi kitosan.

4.5.2. Pengaruh Konsentrasi Bromelin terhadap Aktivitas Enzim

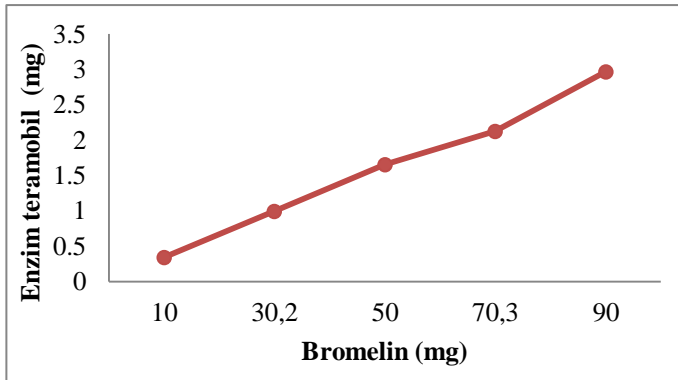
Amobilisasi dipengaruhi oleh konsentrasi enzim, semakin tinggi jumlah enzim yang ditambahkan, maka akan semakin banyak enzim yang teramobil. Amobilisasi enzim dilakukan dengan kitosan dalam jumlah sama sebanyak 250 mg setiap variasi konsentrasi bromelin. Jumlah enzim teramobil variasi konsentrasi bromelin sebagaimana pada Gambar 4.18.



Gambar 4.18. Pengaruh konsentrasi bromelin terhadap enzim yang teramobil pada 250 mg kitosan.

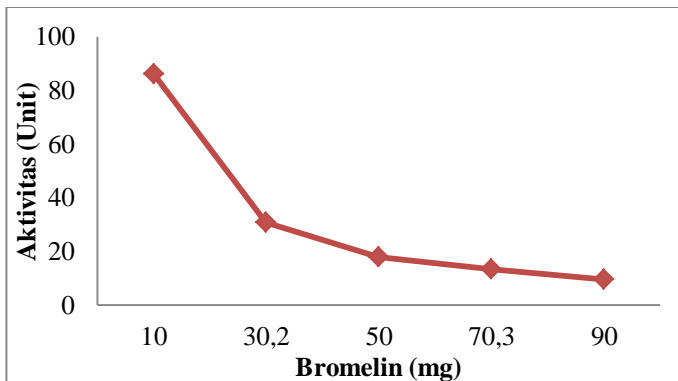
Pada Gambar 4.18 menunjukkan bahwa semakin banyak enzim yang ditambahkan maka akan semakin banyak jumlah enzim yang teramobil. Jumlah enzim yang teramobil tersebut merupakan enzim terdapat dalam massa total (dengan matriks kitosan). Massa total enzim amobil diperoleh jumlah yang berbeda-beda, sehingga pengukuran aktivitas enzim dilakukan dengan menggunakan massa enzim amobil yang sama besar.

Seperti pada variasi kitosan, pengukuran aktivitas enzim amobil variasi konsentrasi bromelin dilakukan dengan cara mengambil 10 mg massa total enzim amobil dari setiap variasi. Jumlah enzim yang teramobil dalam 10 mg massa total ditentukan pada Lampiran H, Tabel H.2. Besarnya jumlah enzim teramobil dalam 10 mg massa totalnya disampaikan pada Gambar 4.19.



Gambar 4.19. Jumlah enzim teramobil dalam 10 mg massa total enzim amobil.

Pada Gambar 4.19, jumlah enzim teramobil dalam 10 mg massa totalnya diketahui bahwa semakin tinggi konsentrasi bromelin akan diperoleh jumlah enzim teramobil juga semakin tinggi. Pada konsentrasi bromelin 90 mg diperoleh jumlah enzim teramobil paling tinggi. Untuk hasil uji aktivitasnya diperoleh pada Gambar 4.20.



Gambar 4.20. Aktivitas enzim amobil variasi konsentrasi bromelin.

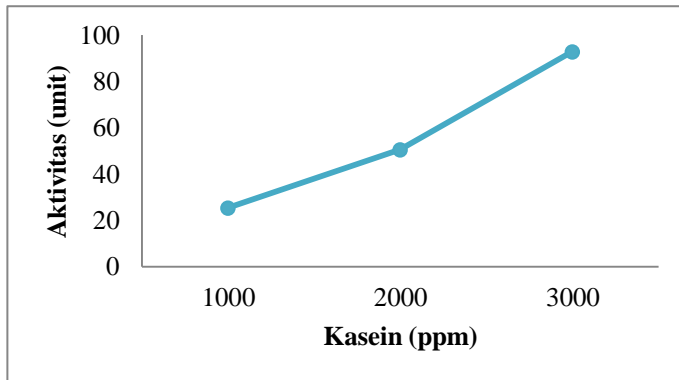
Hasil uji aktivitas enzim pada Gambar 4.20 menunjukkan semakin banyaknya konsentrasi bromelin maka aktivitasnya akan semakin turun. Aktivitas enzim paling tinggi ditunjukkan oleh konsentrasi bromelin 10 mg. Aktivitas enzim amobil dengan perlakuan konsentrasi bromelin 10 mg diperoleh sebesar 86,2607 Unit, sedangkan jumlah enzim yang teramobil didapatkan 9,5417 mg yang paling rendah dibandingkan dengan perlakuan yang lain. Jika aktivitas enzim amobil dikaitkan dengan jumlah enzim teramobil, menunjukkan bahwa semakin rendah enzim yang teramobil maka akan menghasilkan aktivitas yang semakin besar. Dalam penelitian ini, variasi konsentrasi bromelin yang dilakukan belum mencapai optimal, karena dengan semakin rendahnya konsentrasi bromelin menunjukkan peningkatan aktivitas.

Penelitian serupa telah dilakukan oleh Ferdiansyah (2005), dimana dalam penjelasan hasilnya diperoleh bahwa aktivitas enzim bromelin amobil yang rendah dimiliki oleh enzim amobil dengan jumlah protein yang teramobil tinggi. Rendahnya aktivitas enzim yang didalamnya terdapat jumlah enzim yang teramobil tinggi dapat disebabkan oleh perubahan bentuk enzim selama proses amobilisasi, dimana enzim dipengaruhi oleh glutaraldehid yang dapat mengganggu fungsi katalitik enzim sebagaimana penjelasan Zhu dan Sun (2012). Penjelasan Goldstein dan Manecke (1976) mengenai hal tersebut, glutaraldehid berpotensi menghambat aktivitas enzim protease dengan berikatan pada sisi aktif enzim.

4.6. Pengaruh Konsentrasi Substrat terhadap Aktivitas Enzim Bromelin Amobil

Aktivitas enzim bromelin amobil dipengaruhi oleh konsentrasi substrat kasein yang akan didegradasi. Substrat yang berkonsentrasi tinggi akan didegradasi enzim sehingga menghasilkan aktivitas enzim yang besar, begitu pula sebaliknya. Data hasil pengukuran aktivitas enzim bromelin amobil dengan pengaruh konsentrasi substrat disajikan pada Gambar 4.21. Pada penelitian ini sesuai dengan literatur yang menjelaskan bahwa

aktivitas enzim akan meningkat sejalan dengan semakin tinggi konsentrasi substrat.



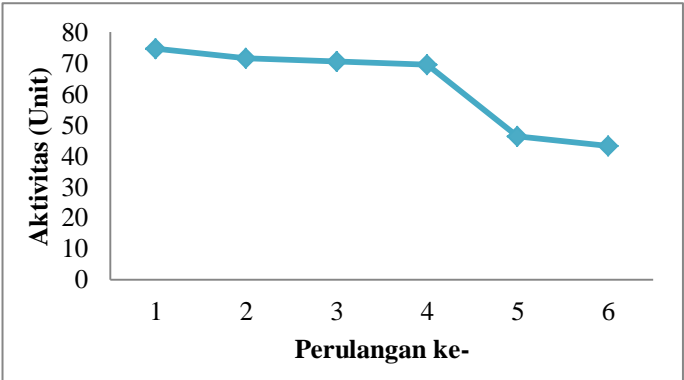
Gambar 4.21. Pengaruh konsentrasi substrat kasein terhadap aktivitas enzim amobil.

Pada konsentrasi substrat yang tinggi, sisi aktif enzim dapat menampung substrat lebih banyak, maka kompleks enzim-substrat menjadi banyak sehingga kecepatan reaksi yang dihasilkan yang besar. Sebaliknya jika konsentrasi substrat rendah, maka kompleks enzim-substrat sedikit sehingga kecepatan reaksi juga kecil. Pada konsentrasi substrat tertentu dapat terjadi kondisi stagnan atau tidak ada kenaikan kecepatan reaksi meskipun konsentrasi substrat diperbesar. Hal ini enzim telah jenuh dengan substrat dan enzim telah pada kecepatan reaksi maksimumnya. Dalam penelitian ini, penggunaan konsentrasi substrat yang diuji belum mencapai keadaan optimum dilihat dari grafik Gambar 4.21 yang semakin meningkat.

4.7. Pengaruh Perulangan Penggunaan Enzim Bromelin Amobil terhadap Aktivitas Enzim

Keuntungan penggunaan enzim amobil adalah dapat digunakan berulang hingga beberapa kali. Hal ini dikarenakan enzim amobil mudah dipisahkan kembali dari larutan produknya. Enzim bromelin amobil pada penelitian ini digunakan hingga

enam kali penggunaan dengan aktivitas enzim sebagaimana pada Gambar 4.22.



Gambar 4.22. Pengaruh perulangan penggunaan enzim amobil terhadap aktivitas enzim.

Pada Gambar 4.22, perulangan ke-1 hingga ke-4 penggunaan enzim amobil menunjukkan penurunan aktivitas kurang dari 10%. Sedangkan perulangan ke-5 menunjukkan penurunan aktivitas yang drastis mencapai 38%. Hingga perulangan ke-6, penurunan aktivitasnya mencapai 42%. Kondisi penggunaan enzim dapat diketahui dengan menentukan efisiensi perulangan sebagaimana Tabel 4.1.

Tabel 4.1. Efisiensi perulangan penggunaan enzim amobil.

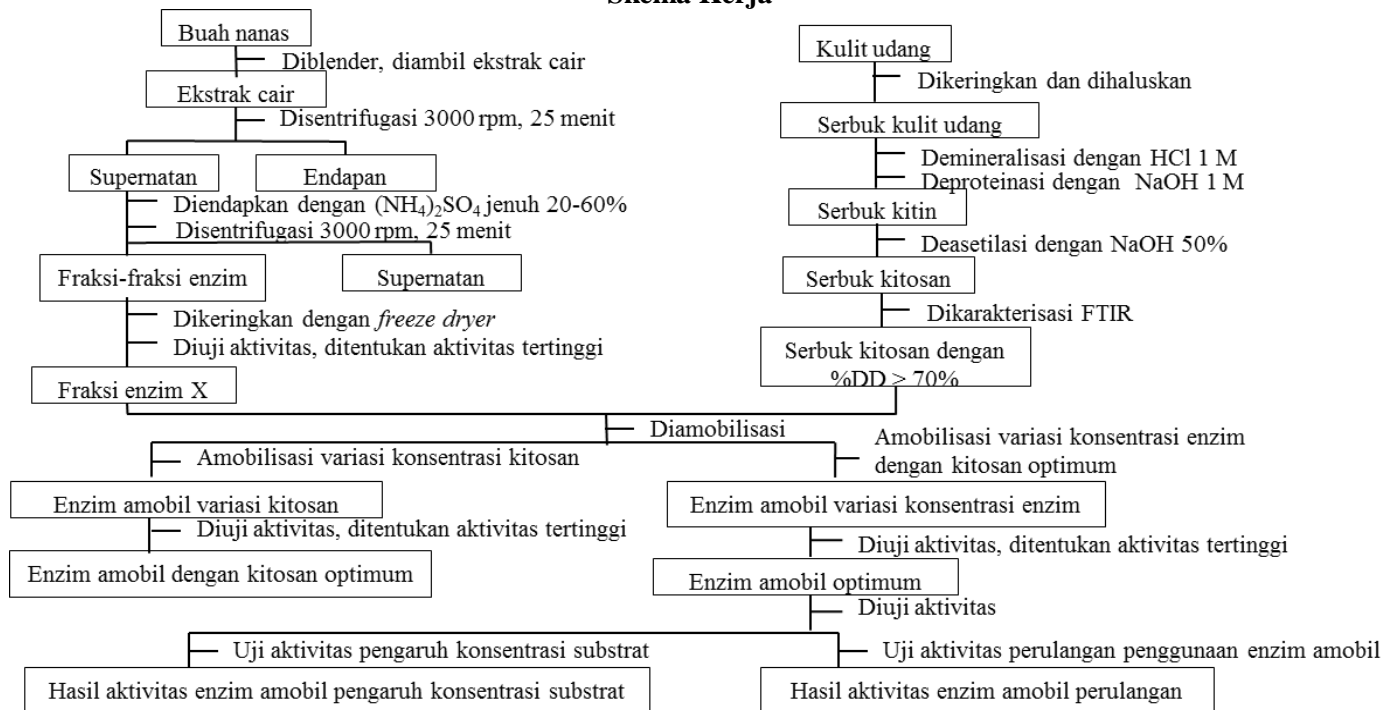
Perulangan ke-	Aktivitas (Unit)	Efisiensi (%)
1	74,7327	100
2	71,5705	95,77
3	70,5165	94,36
4	69,4624	92,95
5	46,2731	61,92
6	43,1109	57,69

Berdasarkan Tabel 4.1, pada setiap perulangan diperoleh efisiensi yang semakin menurun. Hal ini berhubungan dengan aktivitas enzim yang semakin menurun, dimana kemampuan enzim untuk mengkatalisis reaksi akan semakin berkurang tiap perulangan. Penurunan aktivitas ini dimungkinkan karena rusaknya ikatan enzim dengan matriks pendukung kitosan yang mengakibatkan perubahan konformasi enzim dan menyebabkan jumlah enzim yang dapat berikatan dengan substrat semakin sedikit. Perulangan yang dilakukan hingga enam kali ini masih menunjukkan efisiensi penggunaannya sebesar 57,69%. Hal ini didasarkan pada penelitian Roosdiana, dkk. (2009) yang menyatakan bahwa perulangan penggunaan enzim amobil dikatakan baik apabila efisiensi penggunaan masih di atas 50%.

Halaman ini sengaja dikosongkan.

LAMPIRAN A

Skema Kerja



LAMPIRAN B

Pembuatan Larutan

1. NaOH 0,4 M (100 mL)

$$M = \text{mol} / V$$

$$M = (m / M_r) / V$$

$$m = M \times M_r \times V$$

$$m = 0,4 \text{ M} \times 40 \text{ gram/mol} \times 0,1 \text{ L}$$

$$m = 1,6 \text{ gram}$$

2. NaOH 1 M (100 mL)

$$m = M \times M_r \times V$$

$$m = 1 \text{ M} \times 40 \text{ gram/mol} \times 0,1 \text{ L}$$

$$m = 4 \text{ gram}$$

3. Kasein 5000 ppm (100 mL)

$$5000 \text{ ppm} = 5000 \text{ mg/L}$$

$$= 5000 \text{ mg} / 1000 \text{ mL}$$

$$= 500 \text{ mg} / 100 \text{ mL}$$

4. Buffer Fosfat pH 6

a. Larutan Na_2HPO_4

- Larutan Na_2HPO_4 0,2 M (100 mL)

$$m = M \times M_r \times V$$

$$m = 0,2 \text{ M} \times 178 \text{ gram/mol} \times 0,1 \text{ L}$$

$$m = 3,56 \text{ gram}$$

- Larutan Na_2HPO_4 0,02 M (100 mL)

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 0,2 \text{ M} = 100 \text{ mL} \times 0,02 \text{ M}$$

$$V_1 = (100 \text{ mL} \times 0,02 \text{ M}) / 0,2 \text{ M}$$

$$V_1 = 10 \text{ mL}$$

b. Larutan NaH_2PO_4

- Larutan NaH_2PO_4 0,2 M (100 mL)

$$m = M \times M_r \times V$$

$$m = 0,2 \text{ M} \times 156 \text{ gram/mol} \times 0,1 \text{ L}$$

$$m = 3,12 \text{ gram}$$

- Larutan NaH_2PO_4 0,02 M (100 mL)

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 0,2 \text{ M} &= 100 \text{ mL} \times 0,02 \text{ M} \\ V_1 &= (100 \text{ mL} \times 0,02 \text{ M}) / 0,2 \text{ M} \\ V_1 &= 10 \text{ mL} \end{aligned}$$

- c. Buffer Fosfat 0,02 M pH 6 (100 mL)
 Komposisi buffer fosfat pH 6:
 $V \text{ larutan a} + V \text{ larutan b} = 8,87 \text{ mL} + 1,13 \text{ mL}$

5. Glutaraldehyd 5% (100 mL)

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 25\% &= 100 \text{ mL} \times 5\% \\ V_1 &= (100 \text{ mL} \times 5\%) / 25\% \\ V_1 &= 20 \text{ mL} \end{aligned}$$

LAMPIRAN C

Derajat Deasetilasi Kitin

1. Deasetilasi Pertama

Pengukuran panjang: $DF_1 = 8,8 \text{ cm}$
 $DE = 2,2 \text{ cm}$
 $AC = 8,2 \text{ cm}$
 $AB = 0,5 \text{ cm}$

$$A_{1655} = \log \frac{DF_1}{DE}$$

$$A_{1655} = \log \frac{8,8 \text{ cm}}{2,2 \text{ cm}}$$

$$A_{1655} = 0,602$$

$$A_{3450} = \log \frac{AC}{AB}$$

$$A_{3450} = \log \frac{8,2 \text{ cm}}{0,5 \text{ cm}}$$

$$A_{3450} = 1,215$$

$$\% \text{ DD} = 100 - \left(\frac{A_{1655}}{A_{3450}} \times \frac{100}{1,33} \right)$$

$$\% \text{ DD} = 100 - \left(\frac{0,602}{1,215} \times \frac{100}{1,33} \right)$$

$$\% \text{ DD} = 62,75$$

2. Perulangan Deasetilasi

Pengukuran panjang: $DF_1 = 6,7 \text{ cm}$
 $DE = 4,7 \text{ cm}$
 $AC = 4,9 \text{ cm}$
 $AB = 0,5 \text{ cm}$

$$A_{1655} = \log \frac{DF_1}{DE}$$

$$A_{1655} = \log \frac{6,7 \text{ cm}}{4,7 \text{ cm}}$$

$$A_{1655} = 0,514$$

$$A_{3450} = \log \frac{AC}{AB}$$

$$A_{3450} = \log \frac{4,9 \text{ cm}}{0,5 \text{ cm}}$$

$$A_{3450} = 0,991$$

$$\% \text{ DD} = 100 - \left(\frac{A_{1655}}{A_{3450}} \times \frac{100}{1,33} \right)$$

$$\% \text{ DD} = 100 - \left(\frac{0,514}{0,991} \times \frac{100}{1,33} \right)$$

$$\% \text{ DD} = 88,32$$

LAMPIRAN D

Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Tabel D.1. Pengukuran absorbansi larutan kasein 5001 ppm.

λ (nm)	A ₁	A ₂	A ₃	A _{rata-rata}
500	0,398	0,399	0,399	0,3986
505	0,427	0,429	0,428	0,4280
510	0,457	0,457	0,456	0,4566
515	0,480	0,482	0,482	0,4813
520	0,503	0,503	0,504	0,5033
525	0,522	0,522	0,523	0,5223
530	0,540	0,539	0,539	0,5393
535	0,537	0,536	0,535	0,5360
540	0,548	0,549	0,550	0,5490
545	0,551	0,552	0,550	0,5510
550	0,556	0,554	0,555	0,5550
555	0,551	0,550	0,551	0,5506
560	0,541	0,541	0,540	0,5406
565	0,515	0,515	0,516	0,5153
570	0,510	0,512	0,511	0,5110
575	0,498	0,499	0,499	0,4986
580	0,486	0,485	0,486	0,4856
585	0,467	0,468	0,468	0,4676
590	0,450	0,449	0,449	0,4493
595	0,427	0,429	0,427	0,4276
600	0,405	0,406	0,406	0,4056

LAMPIRAN E
Data Absorbansi Larutan Kasein pada Penentuan Kurva
Standar Kasein

Tabel E.1. Pengukuran absorbansi variasi konsentrasi kasein.

Volume kasein (mL)	Konsentrasi (ppm)	A₁	A₂	A₃	A_{rata-rata}
0,5	250	0,051	0,050	0,052	0,0510
1	500	0,101	0,102	0,100	0,1010
1,5	750	0,152	0,150	0,151	0,1510
2	1000	0,200	0,200	0,199	0,1996
2,5	1250	0,250	0,248	0,249	0,2490
3	1500	0,298	0,299	0,298	0,2983
3,5	1750	0,345	0,346	0,345	0,3453
4	2000	0,393	0,394	0,394	0,3936
4,5	2250	0,437	0,438	0,437	0,4373
5	2500	0,482	0,481	0,483	0,4820
5,5	2750	0,522	0,522	0,521	0,5216
6	3000	0,559	0,558	0,558	0,5583

LAMPIRAN F
Aktivitas Fraksi Enzim Bromelin

Tabel F.1. Uji aktivitas fraksi enzim hasil pengendapan dengan amonium sulfat jenuh.

Jenis nanas	Fraksi enzim (%)	Massa fraksi enzim (mg)	Absorbansi kasein + enzim (A)	Konsentrasi terukur (ppm)	Konsentrasi sebenarnya (ppm)	Massa kasein + enzim (mg)	Massa kasein sisa (mg)	Massa protein terdegradasi (mg)	Aktivitas (Unit)
Nanas Mentah	20	5,1	0,339	1650,5	2750,83	27,5083	22,4083	7,5917	12,4047
	30	5	0,326	1585,5	2642,50	26,4250	21,4250	8,5750	14,2917
	40	5	0,318	1545,5	2575,83	25,7583	20,7583	9,2417	15,4028
	50	5,1	0,320	1555,5	2592,50	25,9250	20,8250	9,1750	14,9918
	60	5,2	0,322	1565,5	2609,16	26,0916	20,8917	9,1083	14,5967
Nanas Matang	20	5	0,350	1705,5	2842,50	28,4250	23,4250	6,5750	10,9583
	30	5,1	0,335	1630,5	2717,50	27,1750	22,0750	7,9250	12,9493
	40	5	0,318	1545,5	2575,83	25,7583	20,7583	9,2417	15,4028
	50	5	0,319	1550,5	2584,16	25,8416	20,8417	9,1583	15,2639
	60	5,1	0,319	1550,5	2584,16	25,8416	20,7417	9,2583	15,1280

- Catatan:
- Substrat kasein yang digunakan 3000 ppm.
 - Waktu inkubasi 2 jam.

Perhitungan:

- Konsentrasi terukur berdasarkan persamaan 4.1.

$$y = 0,0002x + 0,0089$$

$$x = (y - 0,0089) \times 0,0002$$

$$x = (0,339 - 0,0089) \times 0,0002$$

$$x = 1650,5$$
 Jadi, konsentrasi terukur sebesar 1650,5 ppm.
- Konsentrasi sebenarnya (akibat pengenceran dengan biuret).

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$6 \text{ mL} \times M_1 = 10 \text{ mL} \times 1650,5 \text{ ppm}$$

$$M_1 = (10 \text{ mL} \times 1650,5 \text{ ppm}) / 6 \text{ mL}$$

$$M_1 = 2750,83 \text{ ppm}$$
- Massa kasein + enzim (dalam 10 mL).

$$\text{Kasein+enzim}/10 \text{ mL} = 2750,83 \text{ ppm}$$

$$\text{Kasein+enzim}/10 \text{ mL} = 2750,83 \text{ mg/L}$$

$$\text{Kasein+enzim}/10 \text{ mL} = 2750,83 \text{ mg}/1000 \text{ mL}$$

$$\text{Kasein+enzim} = (2750,83 \text{ mg}/1000 \text{ mL}) \times 10 \text{ mL}$$

$$\text{Kasein+enzim} = 27,5083 \text{ mg}$$
- Massa kasein sisa = Massa kasein+enzim – Massa enzim

$$= 27,5083 \text{ mg} - 5,1 \text{ mg}$$

$$= 22,4083 \text{ mg}$$
- Massa kasein terdegradasi (pengurangan dari massa kasein awal 3000 ppm/10 mL = 30 mg).

$$\text{Massa kasein terdegradasi} = \text{m. kasein awal} - \text{m. kasein sisa}$$

$$= 30 \text{ mg} - 22,4083 \text{ mg}$$

$$= 7,5917 \text{ mg}$$
- Aktivitas = μg kasein terdegradasi / waktu inkubasi / mg enzim

$$= 7591,7 \mu\text{g} / 120 \text{ menit} / 5,1 \text{ mg}$$

$$= 12,4047 \text{ unit}$$

LAMPIRAN G
Pengaruh Konsentrasi Kitosan pada Amobilisasi Enzim Bromelin

1. Penentuan Jumlah Enzim Teramobil

Tabel G.1. Penentuan jumlah enzim teramobil pada variasi kitosan.

No	Enzim awal (mg)	Kitosan (mg)	Absorbansi protein terlarut (A)	Kadar protein terukur (ppm)	Kadar protein sebenarnya (ppm)	Enzim terlarut (mg)	Jumlah enzim teramobil (mg)
1	50,4	50,2	0,026	85,5	142,5	7,125	43,275
2	50,3	100,6	0,019	50,5	84,166	4,2083	46,0917
3	50,4	150,4	0,016	35,5	59,166	2,9583	47,4417
4	50,1	200,5	0,014	25,5	42,5	2,125	47,975
5	50,1	250,4	0,012	15,5	25,833	1,2916	48,8083

Catatan: - Filtrat amobilisasi diencerkan menjadi 50 mL.

Perhitungan:

- Kadar protein terukur berdasarkan persamaan 4.1.
 $y = 0,0002x + 0,0089$
 $x = (y - 0,0089) \times 0,0002$
 $x = (0,026 - 0,0089) \times 0,0002$
 $x = 85,5$
 Jadi, kadar protein terukur sebesar 85,5 ppm.
- Kadar protein sebenarnya (akibat pengenceran dengan biuret).
 $V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$
 $6 \text{ mL} \times M_1 = 10 \text{ mL} \times 85,5 \text{ ppm}$
 $M_1 = (10 \text{ mL} \times 85,5 \text{ ppm}) / 6 \text{ mL}$
 $M_1 = 142,5 \text{ ppm}$
- Enzim terlarut (dalam 50 mL).
 $\text{Enzim terlarut} / 50 \text{ mL} = 142,5 \text{ ppm}$
 $\text{Enzim terlarut} / 50 \text{ mL} = 142,5 \text{ mg/L}$
 $\text{Enzim terlarut} / 50 \text{ mL} = 142,5 \text{ mg} / 1000 \text{ mL}$
 $\text{Enzim terlarut} = (142,5 \text{ mg} / 1000 \text{ mL}) \times 50 \text{ mL}$
 $\text{Enzim terlarut} = 7,125 \text{ mg}$
- Enzim teramobil = enzim awal – enzim terlarut
 $= 50,4 \text{ mg} - 7,125 \text{ mg}$
 $= 43,275 \text{ mg}$

Tabel G.2. Penentuan jumlah enzim teramobil variasi kitosan dalam 10 mg cuplikan.

No	Variasi kitosan (mg)	Massa total enzim amobil diperoleh (mg)	Jumlah enzim teramobil (mg)	Enzim yang diuji aktivitas (mg)	Enzim teramobil dalam ± 10 mg (mg)
1	50,2	72,2	43,275	10,3	6,1736
2	100,6	129	46,0917	10,1	3,6087
3	150,4	182,6	47,4417	10,3	2,6761
4	200,5	235,4	47,975	10,3	2,0992
5	250,4	285,9	48,8083	10,2	1,7413

Perhitungan:

- Enzim teramobil dalam ± 10 mg (untuk uji aktivitas enzim amobil dari 10 mg cuplikan).

Jumlah enzim teramobil/massa total = $43,275 \text{ mg} / 72,2 \text{ mg} = 0,599$

Jumlah enzim teramobil dalam 10 mg cuplikan = $0,599 \times 10,3 \text{ mg} = 6,1736 \text{ mg}$

2. Penentuan Aktivitas Enzim Amobil Variasi Kitosan

Tabel G.3. Aktivitas enzim amobil variasi kitosan dalam pengujian 10 mg cuplikan.

No	Variasi kitosan (mg)	Enzim teramobil dalam ± 10 mg (mg)	Absorbansi kasein sisa (A)	Konsentrasi terukur (ppm)	Konsentrasi sebenarnya (ppm)	Massa kasein sisa (mg)	Massa kasein terdegradasi (mg)	Aktivitas (Unit)
1	50,2	6,1736	0,334	1625,5	2709,17	27,0917	2,9083	3,9258
2	100,6	3,6087	0,329	1600,5	2667,5	26,675	3,325	7,6781
3	150,4	2,6761	0,331	1610,5	2684,17	26,8417	3,1583	9,8351
4	200,5	2,0992	0,332	1615,5	2692,5	26,925	3,075	12,2072
5	250,4	1,7413	0,333	1620,5	2700,83	27,0083	2,9917	14,3169

Catatan: - Substrat kasein yang digunakan 3000 ppm, 10 mL (massa kasein awal adalah 30 mg).
- Waktu inkubasi 2 jam.

Perhitungan:

- Massa kasein sisa (dalam 10 mL).
 $\text{Kasein sisa}/10 \text{ mL} = 2709,17 \text{ ppm}$
 $\text{Kasein sisa}/10 \text{ mL} = 2709,17 \text{ mg/L}$
 $\text{Kasein sisa}/10 \text{ mL} = 2709,17 \text{ mg}/1000 \text{ mL}$
 $\text{Kasein sisa} = (2709,17 \text{ mg}/1000 \text{ mL}) \times 10 \text{ mL}$
 $\text{Kasein sisa} = 27,0917 \text{ mg}$
- Kasein terdegradasi = massa kasein awal – massa kasein sisa
 $= 30 \text{ mg} - 27,0917 \text{ mg}$
 $= 2,9083 \text{ mg}$
- Aktivitas = $\mu\text{g kasein terdegradasi} / \text{waktu inkubasi} / \text{mg enzim}$
 $= 2908,3 \mu\text{g} / 120 \text{ menit} / 6,1736 \text{ mg}$
 $= 3,9258 \text{ Unit}$
- Perhitungan dengan label yang sama menggunakan cara yang telah dijelaskan sebelumnya.

LAMPIRAN H

Pengaruh Konsentrasi Enzim pada Amobilisasi Enzim Bromelin

1. Penentuan Jumlah Enzim Teramobil

Tabel H.1. Penentuan jumlah enzim teramobil pada variasi konsentrasi bromelin.

No	Variasi enzim (mg)	Kitosan (mg)	Absorbansi protein terlarut (A)	Kadar protein terukur (ppm)	Kadar protein sebenarnya (ppm)	Enzim terlarut (mg)	Jumlah enzim teramobil (mg)
1	10	250,2	0,01	5,5	9,167	0,4583	9,5417
2	30,2	250,1	0,012	15,5	25,833	1,2917	28,9083
3	50	250,2	0,015	30,5	50,833	2,5417	47,4583
4	70,3	250,1	0,031	110,5	184,167	9,2083	61,0917
5	90	250	0,022	65,5	109,167	5,4583	84,5417

Catatan: - Filtrat amobilisasi diencerkan menjadi 50 mL.

Perhitungan:

- Perhitungan dengan label yang sama menggunakan cara yang telah dijelaskan sebelumnya.

Tabel H.2. Penentuan jumlah enzim teramobil variasi konsentrasi bromelin dalam 10 mg cuplikan.

No	Variasi enzim (mg)	Massa total enzim amobil diperoleh (mg)	Jumlah enzim teramobil (mg)	Enzim yang diuji aktivitas (mg)	Enzim teramobil dalam ± 10 mg (mg)
1	10	294	9,5417	10,4	0,3375
2	30,2	303,7	28,9083	10,4	0,9899
3	50	297,6	47,4583	10,4	1,6585
4	70,3	295,8	61,0917	10,3	2,1273
5	90	290,4	84,5417	10,2	2,9694

Perhitungan:

- Enzim teramobil dalam ± 10 mg (pengukuran aktivitas enzim amobil dari 10 mg cuplikan).
 Jumlah enzim teramobil/massa total = $9,5417 \text{ mg} / 294 \text{ mg} = 0,03245$
 Jumlah enzim teramobil dalam 10 mg cuplikan = $0,03245 \times 10,4 \text{ mg} = 0,3375 \text{ mg}$

2. Penentuan Aktivitas Enzim Amobil

Tabel H.3. Aktivitas enzim amobil variasi konsentrasi bromelin dalam pengujian 10 mg cuplikan.

No	Variasi enzim (mg)	Enzim teramobil dalam ± 10 mg (mg)	Absorbansi kasein sisa (A)	Konsentrasi terukur (ppm)	Konsentrasi sebenarnya (ppm)	Massa kasein sisa (mg)	Massa kasein terdegradasi (mg)	Aktivitas (Unit)
1	10	0,3375	0,327	1590,5	2650,83	26,5083	3,4917	86,2067
2	30,2	0,9899	0,325	1580,5	2634,17	26,3417	3,6583	30,7957
3	50	1,6585	0,326	1585,5	2642,5	26,425	3,575	17,9631
4	70,3	2,1273	0,328	1595,5	2659,17	26,5917	3,4083	13,3518
5	90	2,9694	0,328	1595,5	2659,17	26,5917	3,4083	9,5650

Catatan: - Substrat kasein yang digunakan 3000 ppm, 10 mL (massa kasein awal adalah 30 mg).
 - Waktu inkubasi 2 jam.

Perhitungan:

- Perhitungan dengan label yang sama menggunakan cara yang telah dijelaskan sebelumnya.

LAMPIRAN I
Pengaruh Konsentrasi Substrat terhadap Aktivitas Enzim Amobil

Tabel I.1. Aktivitas enzim amobil pada variasi konsentrasi substrat kasein.

No	Enzim amobil diuji (mg)	Enzim teramobil dalam ± 10 mg (mg)	Variasi substrat kasein (ppm)	Absorbansi kasein sisa (A)	Konsentrasi terukur (ppm)	Konsentrasi sebenarnya (ppm)	Massa kasein sisa (mg)	Massa kasein terdegradasi (mg)	Aktivitas (Unit)
1	10,1	0,3278	1000	0,117	540,5	900,83	9,0083	0,9917	25,2108
2	10,1	0,3278	2000	0,225	1080,5	1800,83	18,0083	1,9917	50,6334
3	10,1	0,3278	3000	0,325	1580,5	2634,17	26,3417	3,6583	93,0045

Catatan: - Enzim amobil yang digunakan adalah hasil amobilisasi komposisi 10 mg bromelin dan 250 mg kitosan dengan jumlah total enzim amobil 294 mg dengan jumlah enzim teramobil 9,5417 mg.
 - Waktu inkubasi 2 jam.
 - Substrat kasein masing-masing dalam 10 mL sehingga massa awal berturut-turut 10 mg, 20 mg dan 30 mg.

Perhitungan:

- Perhitungan dengan label yang sama menggunakan cara yang telah dijelaskan sebelumnya.

LAMPIRAN J
Pengaruh Perulangan Penggunaan Enzim Amobil terhadap Aktivitas Enzim

Tabel J.1. Aktivitas enzim amobil dari perulangan penggunaannya.

Perulangan ke-	Enzim amobil diuji (mg)	Enzim teramobil dalam ± 20 mg (mg)	Absorbansi kasein sisa (A)	Konsentrasi terukur (ppm)	Konsentrasi sebenarnya (ppm)	Massa kasein sisa (mg)	Massa kasein terdegradasi (mg)	Aktivitas (Unit)
1	20,3	0,6588	0,298	1445,5	2409,17	24,0917	5,9083	74,7327
2	20,3	0,6588	0,301	1460,5	2434,17	24,3417	5,6583	71,5705
3	20,3	0,6588	0,302	1465,5	2442,5	24,425	5,575	70,5165
4	20,3	0,6588	0,303	1470,5	2450,83	24,5083	5,4917	69,4624
5	20,3	0,6588	0,325	1580,5	2634,17	26,3417	3,6583	46,2732
6	20,3	0,6598	0,328	1595,5	2659,17	26,5917	3,4083	43,1109

Catatan: - Enzim amobil yang digunakan adalah hasil amobilisasi komposisi 10 mg bromelin dan 250 mg kitosan dengan jumlah total enzim amobil 294 mg dengan jumlah enzim teramobil 9,5417 mg.
 - Substrat kasein yang digunakan adalah 3000 ppm, 10 mL (massa kasein awal adalah 30 mg).
 - Waktu inkubasi 2 jam untuk masing-masing perulangan.

Catatan: - Aktivitas enzim amobil pada perulangan ke-1 yaitu 74,7327 unit yang memiliki efisiensi tertinggi 100%, karena enzim amobil pertama kali digunakan.

Perhitungan:

- Efisiensi = (aktivitas ke-2 / aktivitas ke-1) \times 100%
= (71,5705 unit / 74,7327 unit) \times 100%
= 95,77%
- Perhitungan dengan label yang sama menggunakan cara yang telah dijelaskan sebelumnya.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa konsentrasi kitosan dan konsentrasi bromelin berpengaruh terhadap jumlah enzim yang teramobil serta aktivitasnya. Kondisi optimum dari variabel yang dilakukan pada amobilisasi enzim bromelin didapatkan pada konsentrasi kitosan 250,4 mg dan konsentrasi enzim 10 mg dengan total enzim teramobil 9,5417 mg dan aktivitas enzim dalam 10 mg enzim amobil sebesar 86,2067 Unit. Uji aktivitas enzim amobil maksimum pada konsentrasi substrat 3000 ppm dan perulangan penggunaan enzim amobil dapat digunakan hingga enam kali dengan efisiensi 57,69%.

5.2. Saran

Diharapkan pada penelitian selanjutnya dilakukan amobilisasi enzim menggunakan metode lain dengan matriks pendukung kitosan untuk mendapatkan enzim amobil optimum serta efisiensi penggunaannya.

DAFTAR PUSTAKA

- Basuki, B.R. dan Sanjaya, I.G.M. 2009. Sintesis Ikatan Silang Kitosan dengan Glutaraldehid serta Identifikasi Gugus Fungsi dan Derajat Deasetilasinya. *Jurnal Ilmu Dasar* Vol.10, No.1, 93-101.
- Carpette. 2005. *An Introduction to Practical Biochemistry*. Great Britany: Mc Graw Hillbook Company.
- Chaurasiya, R.S. dan Hebbar, H.U. 2013. Extraction of Bromelain from Pineapple Core and Purification by RME and Precipitation Methods. *Separation and Purification Technology* 111: 90-97.
- Chibata, I. 1978. *Imobilized Enzyme, Research and Development*. New York: John Wiley and Sons Inc.
- Day, R.A. dan Underwood, A.L. 2002. *Analisis Kimia Kuantitatif*. Edisi Keenam. Diterjemahkan oleh Hilarius W.H. dan Lameda S. Jakarta: Erlangga.
- Domszy, J.G. dan Roberts, G.A.F. 1985. Evaluation of Infrared Spectroscopic Techniques for Analyzing Chitosan. *Makromol Chem.* 186: 1671-1677.
- Eskin, N.A.M., Handerson, H.M. dan Townsend, R.J. 1990. *Biochemistry of Foods*. New York: Academic Press Inc.
- Ferdiansyah, V. 2005. Pemanfaatan Kitosan dari Cangkang Udang sebagai Matriks Penyangga pada Imobilisasi Enzim Protease. Institut pertanian Bogor. Skripsi.
- Gautam, S.S., Mishra, S.K., Dash, V., Goyal A.K. dan Rath, G. 2010. Comparative Study of Extraction, Purification and Estimation of Bromelain from Stem and Fruit of Pineapple Plant. *Thai Jurnal Pharmaceutical Science* 34: 67-76.
- Gildberg, A. dan Stenberg, E. 2001. A New Process for Advanced Utilisation of Shrimp Waste. *Process Biochem* 36: 809-812.

- Glasston, S. 1960. Textbook of Physical Chemistry. Second Edition. London: Macmillan and Co. Ltd.
- Goldstein, L. dan Menecke, G. 1976. The Chemistry of Enzyme Immobilization. Applied Biochemistry and Bioengineering Vol.1. New York: Academi Press.
- Hairi, M. 2010. Pengaruh Umur Buah Nanas dan Konsentrasi Ekstrak Kasar Enzim Bromelin pada Pertumbuhan Virgin Coconut Oil dari Buah Kelapa Typical (*Cocos nucifera* L.). Universitas Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Skripsi.
- Hanafeld, U., Gardossi, L. dan Magner, E. 2009. Understanding Enzyme Immobilization. Chemical Society Reviews 38: 453-468.
- Herdyastuti, N. 2006. Isolasi dan Karakterisasi Ekstrak Kasar Enzim Bromelin Batang Nanas (*Ananas comusus* L.merr). Berk. Panel. Hayati 12: 75-77.
- Huda, N. 2001. Pemeriksaan Kinerja Spektrofotometer UV-Vis GBC 911A Menggunakan Pewarna Tartrazine CL 19140. Sigma Epsilon No.20-21.
- Khan, T.A., Peh, K.K. dan Ching, H.S. 2002. Reporting Degree of Deacetylation of Chitosan: the Influence of Analytical Method. J Pharm Pharmaceut Sci., 5(3): 205-212.
- Khopkar, S.M. 1990. Konsep Dasar Kimia Analitik. Jakarta: UI Press.
- Khopkar, S.M. 2003. Konsep Dasar Kimia Analitik. Edisi Pertama. Diterjemahkan oleh A. Sptorahardjo. Jakarta: UI Press.
- Krajewska, B. 2004. Application of Chitin-and Chitosan-based Material for Enzyme Immobilizations: a Review. Enzyme and Microbial Technology. Enzyme and Microbial Technology 35: 126-139.

- Kumari, S., Rath, P., Kumar, A.S.H. dan Tiwari, T.N. 2015. Extraction and Characterization of Chitin and Chitosan from Fishery Waste by Chemical Method. *Environmental Technology & Innovation*. *Environmental Technology & Innovation* 3: 77-85.
- Kurniasih, M. dan Dwiasi, D.W. 2007. Preparasi dan Karakterisasi Kitin dari Udang Putih (*Litopenaeus vannamei*). *Molekul* Vol.2, No.2, 79-87
- Lee, D.W. 2004. Engineered Chitosans for Drug Detoxification Preparation, Characterization and Drug Uptake Studies. University of Florida. Dissertasi.
- Marganov. 2003. Potensi Limbah Udang sebagai Penyerap Logan Berat (Timbal, Kadmium dan Tembaga) di Perairan. Institut Pertanian Bogor. Dissertasi.
- Maryam, S. 2009. Ekstrak Enzim Bromelin dari Buah Nanas (*Ananas sativus Schult.*) dan Pemanfaatannya pada Isolasi DNA. Universitas Negeri Semarang. Skripsi.
- Miao, Y. dan Swee, N.T. 2000. Amperometric Hydrogen Peroxide Biosensor based on Immobilization of Peroxides in Chitosan Matrix Crosslinked with Glutaraldehyde. *Analyst* 125: 1591-1594.
- Montgomery, R. 1993. Biokimia Berorientasi pada Kasus Klinis. Jakarta: Binapura Aksara.
- Mulja, M. dan Suharman. 1995. Aplikasi Analisis Spektrofotometri UV-Vis. Jakarta: Erlangga.
- Murray, R.K., Granner, D.K. dan Rodwell, V.W. 2009. Biokimia Harper. Edisi 27. Diterjemahkan oleh Brahm U.P. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Noor, I. 2010. Isolasi dan Karakterisasi B-Glukan dari Tubuh Buah Jamur Tiram Putih (*Pleurotus ostreatus*) dengan

Metode Spektroskopi UV-Visible dan FTIR. UIN Syarif Hidayatullah. Skripsi.

Owen, T. 2000. *Fundamental of UV-Visible Spectroscopy*. Jerman: Agilent Technologies.

Pavia, D.L., Gary, M.L., George, S.K. dan James, R.V. 2009. *Introduction to Spectroscopy* 4th Ed. USA: PrePress PMG.

Pecsok, R.L., Shuleds, L.D., Cairns, T. dan Mcwilliam, I.G. 1976. *Modern Methods of Chemical Analysis*. Second Edition. New York: John Wiley and Sons, Inc.

Phadungath, C. 2004. Casein Micelle Structure: a Concise Review. *Songklanakarin J. Sci. Techno* 27(1): 201-212.

Ramirez, M.A., Rodriguez, A.T., Afonso, L. dan Peniche, C. 2010. Chitin and its Derivatives as Biopolymers with Potential Agricultural Applications. *Biotechnologia Aplicada* 27: 270-276.

Roosdiana, A., Setianingsih, T., Mardiana, D. dan Suratmo. 2009. Characterization of Immobilized Lipase in Aluminosilicate for Lactosyl Palmitate Synthesis. *Indonesia Journal Chemical* 9: 201-205.

Rukmini, H.S. dan Nur, M.A. 2008. *Pengantar Kimia Buku Panduan Kuliah Biokimia*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.

Salahudin, F. 2011. Pengaruh Bahan Pengendap pada Isolasi Enzim Bromelin dari Bonggol Nanas. *Biopropal Industri* Vol.02, No.01.

Silverstein, R.M., Bassler, G.C. dan Morrill, T.C. 1986. *Penyidikan Spektrometrik Senyawa Organik* Fourth Edition. Diterjemahkan oleh A.J. Hartomo dan Anny V.P. Jakarta: Erlangga.

Skoog, D.A. dan West, D.M. 1971. *Principles of Instrumental Analysis*. New York: Holt, Rinehart and Wiston, Inc.

- Soeparno, Rihastuti, I. dan Triatmojo, S. 2001. Dasar Teknologi Hasil Ternak. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Stuart, B.H. 2004. Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications. USA: John Wiley and Sons, Ltd.
- Supartono. 2004. Karakterisasi Enzim Protease Netral dari Buah Nanas Segar. Jurnal MIPA 27(2): 134-142.
- Thate, M.R. 2004. Synthesis and Antibacterial Assessment of Water-Soluble Hydrophobic Chitosan Derivatives Bearing Quaternary Ammonium Functionality. Louisiana. Disertasi
- Tressler, D. K. dan Joslyn, M. A. 1971. Fruit and Vegetable Juice Processing Technology. Second Edition. USA: The AVI Publishing. Com. Inc.
- Triyati, E. 1985. Spektrofotometer Ultra-Violet dan Sinar Tampak serta Aplikasinya dalam Oseanologi. Oseana Vol.X, No.1: 39-47.
- Winarno, F.G. 1982. Kimia Pangan dan Gizi. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama.
- Wuryanti. 2004. Isolasi dan Penentuan Aktivitas Spesifik Enzim Bromelin dari Buah Nanas (*Ananas comosus L.*). JKSA. Vol.VII, No.3.
- Yuwono, T. 2007. Biologi Molekular. Jakarta: Erlangga.
- Zhu, J. dan Sun, G. 2012. Lipase Immobilization on Glutaraldehyde-Activated Nanofibrous Membranes for Improved Enzyme Stabilities and Activities. Reactive & Functional Polymers 72: 839-845.

BIODATA PENULIS



Lahir di Demak pada tanggal 4 Februari 1994. Menempuh pendidikan di TK Cahyarini Wilalung, SDN 3 Wilalung, MTs. Tarbiyatul Muhtadiin Wilalung dan MA NU Assalam Kudus. Melanjutkan pendidikan S1 di Jurusan Kimia FMIPA ITS pada tahun 2012 melalui jalur kemitraan Kementrian Agama RI yang terdaftar dengan NRP 1412100702. Tahun kedua aktif berorganisasi di UK Pramuka ITS sebagai Bendahara dan melanjutkan di tahun ketiga sebagai Wakil Ketua UK Pamuka ITS. Selain itu, aktif dalam komunitas CSSMoRA ITS sebagai anggota dan pengurus. Pernah melaksanakan kerja praktek di Lab Forensik Polda Surabaya sub bidang Narkobafor pada tahun keempat. Melaksanakan penelitian tugas akhir sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana di Jurusan Kimia FMIPA ITS dengan judul Optimasi Amobilisasi Bromelin dengan Matriks Pendukung Kitosan di bawah bimbingan Drs. Refdinal Nawfa, M.S. Penulis dapat dihubungi melalui email malihasya.bana@gmail.com.